

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«__» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Технологія виробництва нітрагіну. Дільниця біосинтезу»

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-61

Бакальчук Марія Миколаївна _____

Керівник:

Доцент каф. промислової біотехнології, к.б.н.,

Богдан Тетяна Зиновіївна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу:

Доцент каф. біотехніки та інженерії, к.т.н.,

Шибєцький Владислав Юрійович _____

Рецензент:

Професор каф. екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н.,

Саблій Лариса Андріївна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному проєкті немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань.

Студентка _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП 6101. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	104	
3	A1	ДП 6101. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП 6101. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 6101. 03.000 ТК	Ферментер. Вид загальний	1	

				ДП 6101 00.000.00		
	ПБ	Підп.	Дата			
Розробн.	Бакальчук М.М.			Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Керівн.	Богдан Т.З.				1	104
Консульт.					КП ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-61	
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Бакальчук Марії Миколаївні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва нітрагіну. Дільниця біосинтезу», керівник проєкту Богдан Тетяна Зиновіївна доц., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с
2. Термін подання студентом проєкту _____
3. Вихідні дані до проєкту: штам-продуцент *Rhizobium meliloti* Л5-1/24; ферментер для промислового культивування - об'єм 0,13 м³; параметри культивування: $t = 25-28\text{ }^{\circ}\text{C}$, аерація, $\tau = 22-25$ год; кінцевий продукт – препарат сухого нітрагіну в поліетиленових пакетах по 200/400/1000 г для підвищення урожайності зеленої маси люцерни
4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва нітрагіну; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні

фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шибєцький В. Ю., доц. каф. біотехніки та біоінженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	01.04.20 - 8.04.20	
2.	Технологічна частина	09.04.20-15.04.20	
3.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	16.04.20-22.04.20	
4.	Складання апаратурної схеми	23.04.20-29.04.20	
5.	Біохімічні основи виробництва	30.04.20-05.05.20	
6.	Методи отримання промислових продуцентів	6.05.20-12.05.20	
7.	Оформлення пояснювальної записки	30.05.20-10.06.20	

Студент

Марія БАКАЛЬЧУК

Керівник

Тетяна БОГДАН

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва нітрагіну.
Дільниця біосинтезу»**

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт : 104 с., 16 рис., 8 табл., 58 посилань.

Робота присвячена удосконаленню типової технології виготовлення препарату нітрагіну для збільшення ефективності його використання.

Запропоновано в якості продуцента використовувати штам *Rhizobium meliloti* Л5-1/24, отриманий у результаті селекції найбільш ефективних варіантів популяції із культури *Rhizobium meliloti* Л5-1, що характеризується високим рівнем азотфіксації. Запропоновані оптимізоване середовище культивування та спосіб отримання сухого препарату нітрагіну, що забезпечують підвищення ефективності його використання.

Розраховано та вибрано ферментаційне обладнання номінальним об'ємом 130 л та з коефіцієнтом заповнення 0,38, що дозволяє забезпечити необхідні параметри культивування та розраховану річну продуктивність у 5529,6 кг препарату на рік. Наведено технологічний, конструктивний та гідравлічний розрахунки ферментаційного апарату з механічним перемішуючим пристроєм та барботером. В роботі обґрунтовані та подані технологічна та апаратурна схеми виробництва.

БАКТЕРІАЛЬНІ ДОБРИВА, НІТРАГІН, АСОЦІАТИВНІ АЗОТФІКСАТОРИ, RHIZOBIUM MELILOTI, АЗОТФІКСАЦІЯ, ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, ФЕРМЕНТАЦІЙНИЙ АПАРАТ, ПРОЦЕС БІОСИНТЕЗУ.

ABSTRACT

Diploma project: 104 pages, 16 figures, 8 tables, 58 references.

The work is devoted to improving the existing technology of nitragin production to increase the efficiency of its use.

It is proposed to use as a producer a strain of *Rhizobium meliloti* JI5-1/24, obtained by selection of the most effective variants of the population from the culture of *Rhizobium meliloti* JI5-1. The strain is characterized by a high level of nitrogen fixation. An optimized cultivation medium and a method of production of dry nitragin are proposed to increase efficiency of its usage.

Fermentation apparatus with a nominal volume of 130 l and a filling factor of 0.38 was calculated and selected. It allows to provide the necessary cultivation parameters and calculated annual productivity of 5529.6 kg of the preparation per year. Technological, constructive and hydraulic calculations of the fermentation apparatus with a mechanical stirring device and a bubbler are given. The technological and hardware configuration of production are substantiated and presented in the work.

BACTERIAL FERTILIZERS, NITRAGIN, ASSOCIATIVE NITROGEN-FIXING MICROORGANISMS, RHIZOBIUM MELILOTI, NITROGEN FIXATION, NUTRITIONAL MEDIUM, FERMENTATION APPARATUS, THE PROCESS OF BIOSYNTHESIS.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
1.1. Основні промислові продуценти.....	11
1.2. Морфолого-цитологічні ознаки.....	12
1.3. Культуральні ознаки.....	12
1.4. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	12
1.5. Поширення в природі.....	13
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	17
2.1. Характеристика кінцевого продукту.....	17
2.2. Схема хімічних перетворень.....	17
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	21
2.4. Механізм впливу цільового продукту.....	21
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ....	26
3.1. Генетична вивченість об'єкту.....	26
3.1.1. Наявність генетичних карт продуценту.....	26
3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту.....	34
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту.....	37
3.3. Схема отримання продуценту, що використовується в роботі.....	38
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	41
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	41
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	42
4.3. Опис технологічного процесу.....	53
4.4. Матеріальний баланс.....	58
4.5. Контроль виробництва.....	61

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ	
ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	70
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних	
матеріалів для окремих елементів апарату.....	70
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	74
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання.....	92
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	92
ВИСНОВКИ.....	97
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	98

ВСТУП

Зниження якості продукції рослинництва, падіння природної родючості ґрунтів обумовлюють потребу в нових методах ресурсозберігаючого ведення землеробства. На даний момент основним методом збереження або відновлення поживних речовин в ґрунті і підвищення врожайності є внесення мінеральних добрив. Одним із найважливіших лімітуючих макроелементів для росту і розвитку рослин є мінеральний азот. Тому кожен рік в усьому світі в ґрунт вноситься 85-90 метричних тон азотних добрив [1]. При цьому ефективність використання мінерального азоту низька. Близько 50% азотних добрив, що застосовуються в системах вирощування, не поглинається рослинами, підвищуючи собівартість сільськогосподарської продукції і сприяючи забрудненню навколишнього середовища [2; 3].

Таким чином, підвищення ефективності використання азоту сільськогосподарськими культурами є однією з ключових і актуальних проблем сьогодення. Бактеріальні біодобрива є важливим резервом для скорочення використання неорганічних добрив.

У даній роботі розглядається виробництво нітрагіну. Нітрагін – це препарат бульбочкових бактерій роду *Rhizobium*. Інокуляція рослин високоефективними штамами ризобій (нітрагінізація) підвищує продуктивність бобових в середньому на 10-25% за рахунок азотфіксації [4].

Сучасні технології виробництва нітрагіну дозволяють отримати препарати, що містять високі концентрації життєздатних мікроорганізмів (декілька мільярдів КУО на 1 г або мл продукту). Основною проблемою при виробництві бактеріальних добрив є контамінація при тривалому зберіганні продукту та короткий термін зберігання препарату, що може стати причиною низької ефективності добрива.

Тому метою роботи є удосконалення типової технології виготовлення препарату нітрагіну для збільшення ефективності його використання.

У відповідності до мети були визначені наступні задачі:

1. Підібрати ефективний штам *Rhizobium* для виробництва нітрагіну.

2. Запропонувати склад поживного середовища для культивування обраного штаму для зниження ризику контамінації при тривалому зберіганні препарату.

3. Оптимізувати метод отримання сухої форми препарату.

4. Розробити принципову технологічну та апаратурну схеми виробництва препарату сухого нітрагіну.

Новизною даного проєкту є удосконалення типової технології за рахунок модифікації складу поживного середовища та оптимізації методу отримання сухого препарату нітрагіну, що дозволяє підвищити життєздатність бактерій при висушуванні, а, отже, і збільшити його ефективність.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти

Для забезпечення азотного живлення рослин у виробництві бактеріальних добрив використовують азотфіксуючі бактерії роду *Rhizobium*, які є основою препарату нітрагіну.

Бактерії роду *Rhizobium* – це грамнегативні палички розміром $(0,5-0,9) \times (1,2-3,0)$ мкм, аеробні, не утворюють спор. Клітини рухливі, мають від двох до шести перитрихіальних джгутики або один полярний. Оптимальними умовами для росту бактерій цього роду є температура 25-30°C та pH 6,0-7,0 [5]. Підрозділяються на бактерії з швидким ростом (бактерії гороху, люцерни, конюшини, квасолі) і з повільним ростом (бактерії люпину, сої, арахісу) [6].

Бактерії роду *Rhizobium* розвиваються у кореневій системі бобових рослин та в симбіозі з ними фіксують атмосферний азот. При цьому бактерії володіють специфічністю щодо рослини-хазяїна. Ця особливість покладена в основу класифікації цих бактерій всередині виду. Наприклад, для бактерій *Rh. leguminosarum* рослиною-хазяїном є горох, кормові боби, сочевиця, чина, вика, *Rh. japonicum* – соя, *Rh. trifolii* – конюшина, *Rh. vigna* – вигна, маїс, арахіс [7]. Деякі штами роду *Rhizobium* можуть формувати симбіотичні зв'язки з видами, що не належать до родини бобових, наприклад з рослинами роду *Parasponia* [8].

У даній роботі розглядається штам *Rhizobium meliloti* Л5-1/24, що використовується для виготовлення бактеріальних добрив під люцерну. Люцерна – високоврожайна, зимостійка й посухостійка багаторічна кормова культура, яка є багатим джерелом повноцінного за амінокислотним складом протеїну, каротину. Її листя містить ксантофіл, вітаміни, мікроелементи, безазотні екстрактивні речовини (глюкоза, сахароза, крохмаль – близько 10-12%). Також вирощування люцерни здатне покращувати агрохімічні властивості ґрунту і значно зменшує затрати на азотні добрива, при введенні її в посівобіг [9]. Тому вирощування люцерни є науково і економічно обґрунтованим.

Штам здатний *Rhizobium meliloti* Л5-1/24 підвищувати урожайність зеленої маси люцерни і вміст загального азоту на 28% і гумусу на 25%.

За науковою класифікацією належить до класу Альфа-Протеобактерій, порядок *Rhizobiales*, родина *Rhizobiaceae*.

Систематичне положення мікроорганізму за Берджі:

- Царство – Бактерії
- Підцарство - Протеобактерії
- Категорія – Грамнегативні еубактерії, що мають клітинні стінки
- Група – Грамнегативні, аеробні/мікроаерофільні палички та коки
- Підгрупа – Аероби
- Рід – *Rhizobium*

1.2. Морфолого-цитологічні ознаки

Клітини *Rhizobium meliloti* Л5-1/24 грамнегативні, мають форму дрібних паличок розміром $(0,5-0,7) \times (1,2-2,0)$ мкм, рухливі, мають 2-6 перитрихіальні джгутики. Мають зовнішній слизовий шар. При старінні втрачають рухливість, утворюють бактероїди, які мають вильчату форму. Не утворюють спор.

1.3. Культуральні ознаки

На бобовому агарі утворює круглі, білуваті, блискучі колонії з рівними краями до 5 мм у діаметрі.

1.4. Фізіолого-біохімічні потреби

Аероб. Оптимум температури – 25-28°C. Коефіцієнти швидкості росту бактерій при 15°C зменшуються в половину, в порівнянні з температурою оптимуму.

Всі ризобії мають приблизну однакову толерантність до кислотності середовища, але *Rhizobium meliloti* є найбільш чутливими до кислого середовища (рН 5,0). Тому для оптимального росту необхідно підтримувати рН 6,5-7,5 при культивуванні.

Хемоорганотроф. Тип енергетичного метаболізму – дихання.

Росте на середовищах з вуглеводами з підкисленням середовища. Активно використовує глюкозу, сахарозу, лактозу, галактозу, ксилозу, рамнозу, менш активно використовує сорбіт, маніт. Декстрини не засвоює.

Ферменти шляху Ентнера-Дудорова має більшість вивчених видів ризобій, що обумовлює їх здатність засвоювати С-6 вуглецеві сполуки. Ріст клітин *Rhizobium meliloti* на середовищі з глюкозою показує значну індукцію ферментів цього шляху, в порівнянні з іншими джерелами карбону. *Rhizobium meliloti* також мають повний набір ферментів окиснювального пентозофосфатного шляху.

В клітинах *Rhizobium meliloti* виявлені деякі ферменти шляху Ембдена-Меєргофа-Парнаса – фосфоглюкоізомераза, фруктозобісфосфат альдолаза, триозофосфатізомераза, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, 3-фосфогліцераткіназа, фосфогліцератмутаза та енолаза. Фосфофруктокіназа не виявлена в безклітинних екстрактах. Вважається, що шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса використовується для глюконеогенезу, а не для катаболізму вуглецевих сполук.

Здатність утилізувати галактозу та лактозу пов'язана з активністю β -галактозидази. Здатність утилізувати сахарозу пов'язана з активністю ферменту інвертази.

Метаболізм ксилози відбувається шляхом ізомеризації в ксилулозу за допомогою фермента ксилозоізомерази. з наступним фосфорилуванням з отриманням ксилулозо-5-фосфату. Ксилулозо-5-фосфат може переходити у фруктозо-6-фосфат і гліцеральдегід-3-фосфат через альдолазу і транскетолазу. Фруктозо-6-фосфат потім ізомеризується в глюкозо-6-фосфат, що метаболізується у шляху Ентнера-Дудорова, а гліцеральдегід-3-фосфат метаболізується до пірувату.

В *Rhizobium meliloti* були ідентифіковані два ферменти з поліолдегідрогеназною активністю. Один з них діє на сорбіт, інший – на маніт. Завдяки цим ферментам сорбіт і маніт окислюються до фруктози, що далі метаболізується шляхом зазначеним раніше [10].

Як джерела азоту використовує азотнокислий натрій, амонійні солі, тирозин. Для асиміляції NH_4^+ *Rhizobium meliloti* є два основних шляхи. Асиміляція амонію при його високій концентрації каталізується глутаматдегідрогеназою (GDH), в результаті чого утворюється глутамат. При низькій концентрації амоній спочатку переходить в глутамін, а потім в глутамат в ході ланцюжка реакцій, що каталізується глутамінсинтетазою (GS) і глутаматсинтазою (GOGAT). Реакції, що каталізуються GS-GOGAT, є основним шляхом асиміляції амонію. Кінцевим продуктом глутамат використовується або для синтезу білка, або виступає донором аміногрупи в амінотрансферазних реакціях. Глутамін використовується для синтезу білка та як джерело атомів нітрогену для синтезу пуринів і піримідинів, похідних нікотинамідів, р-амінобензойної кислоти та глюкозамін-6-фосфату [11]. Численні дослідження метаболізму амінокислот і нуклеотидів вказують на те, що їх біосинтез у ризобій відбувається за класичними метаболічними шляхами.

Тест на каталазу позитивний. Молоко з лакмусом пептонізує, утворюючи прозору зону на поверхні. Желатин злегка розріджує. Клітковину не використовує. Тест на гідроліз сечовини негативний.

Штам росте на бобовому агарі (рН = 6,8-7,0), що містить (в г/л): горох – 100; сахароза – 20,0; агар – 20,0.

Росте на мінеральному середовищі (по Фреду) з оптимальним значенням рН = 6,8, що містить (в г/л): K_2HPO_4 – 0,75; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; CaCO_3 – 0,4; дріжджовий екстракт – 3,0; сахароза – 10,0.

Для культивування використовують середовище складу ($\frac{\text{г}}{\text{л}}$) : кукурудзяний екстракт – 6,0; глюкоза – 10,0; NaCl – 0,2; K_2HPO_4 – 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; дріжджовий екстракт – 3,0; вода питна.

Кукурудзяний екстракт – джерело азоту. Для розвитку *Rhizobium meliloti* необхідні вітаміни або амінокислоти. Тому при їх вирощуванні в середовищі додають дріжджовий екстракт – універсальне джерело органічних факторів росту, таких як амінокислоти, азотисті основи і вітаміни. Також є припущення,

що дріжджовий екстракт посилює окисно-відновний потенціал та є сильним донором водню при дихальних процесах. Потреби у мінеральних сполуках частково забезпечуються дріжджовим екстрактом, оскільки він містить залізо, кальцій, магній, калій, натрій. Також додавання у середовища K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaCl$ позитивно впливають на приріст біомаси [12].

До складу клітинної стінки входять ліпополісахариди, циклічні глюкани і екзополісахариди. Клітини мають слизовий шар, що складається з позаклітинних полісахаридів. Утворюють включення полі- β -гідроксibuтирату. Розмножуються поділом [13].

1.5. Поширення в природі

Ризобії можуть потрапляти в ґрунт як в складі комерційних інокулянтів, так і поширюватися разом з насінням або поширюватися повітрям. При штучній інокуляції кількість ризобій, що потрапили у ґрунт, сильно варіює. Високоякісні інокулянти забезпечують потрапляння $2,0 \times 10^3$ – $1,0 \times 10^6$ клітин на одну насінину. Тому внесені штами часто домінують при нодуляції в перший рік використання нової культури. Число клітин ризобій при цьому швидко зростає за рахунок виходу з відмираючих бульбочок. Часто це забезпечує домінування штамів-інокулянтів перших 5-10 років після першої інокуляції [4].

Rhizobium meliloti у природі формують азотфіксуючий симбіоз з рослинами роду *Medicago*, *Melilotus* та з *Trigonella foenumgraecum*. При цьому на коренях рослин розвиваються спеціалізовані структури - бульбочки, що надають бактеріям екологічну нішу і умови для фіксації атмосферного азоту [14].

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Характеристика кінцевого продукту

Нітрагін – це бактеріальне добриво, що отримують на основі активних життєздатних бульбочкових бактерій роду *Rhizobium*, специфічних для кожного виду бобових культур, що використовується в сільському господарстві для підвищення урожаю при обробці насіння [15]. В даній роботі розглядається сухий нітрагін – препарат бактерій штаму *Rhizobium meliloti* Л5-1/24, що підвищує урожайність зеленої маси люцерни. Така форма препарату є зручною та ефективною. Сухим нітрагіном насіння опилують, тобто цей процес можна механізувати. Також при отриманні препарату сухого нітрагіну використовують ліофільний спосіб висушування бульбочкових бактерій, що дозволяє довгий час зберігати життєздатність клітин. Кінцевий продукт виробництва – біомаса бактерій, адсорбована на носії – бентоніті. Готовий препарат має вигляд однорідного порошку від світло-сірого до коричневого кольору.

За сучасною класифікацією біотехнологічної продукції, товарів та послуг нітрагін можна віднести до продуктів агробіотехнології, а саме до групи біодобрих [16].

2.2. Схема хімічних перетворень

Для отримання препарату нітрагіну здійснюють періодичне культивування, що передбачає внесення посівного матеріалу в поживне середовище на початку процесу і отримання культури по досягненню експоненціальної фази розвитку популяції.

Оптимальною температурою для росту *Rhizobium meliloti* Л5-1/24 є 25-28° С, оптимальним рН є 6,5-7,5.

В якості джерела карбону в середовищі для культивування використовується глюкоза, що метаболізується у шляху Ентнера-Дудорова.

Процес (рисунок 2.1) починається з фосфорилування глюкози з затратою однієї молекули АТФ за участі ферменту гексокінази Φ_1 . Глюкозо-6-фосфат під дією глюкозо-6-фосфатдегідрогенази Φ_2 переходить в 6-

фосфоглюконат з відновленням молекули НАДФ^+ до $\text{НАДФ}\cdot\text{H}_2$. Далі фосфоглюконатдегідратаза Φ_3 відщеплює воду від 6-фосфоглюконату з утворенням 2-кето-3-дезоксиглюконових кислот, що дала назву КДФГ-шляху. Вона під дією альдолази Φ_4 розпадається на піруват і 3-фосфогліцеринний альдегід. 3-фосфогліцеринний альдегід окиснюється до пірувату, відновлюючи НАДФ^+ та утворюючи дві молекули АТФ [17].

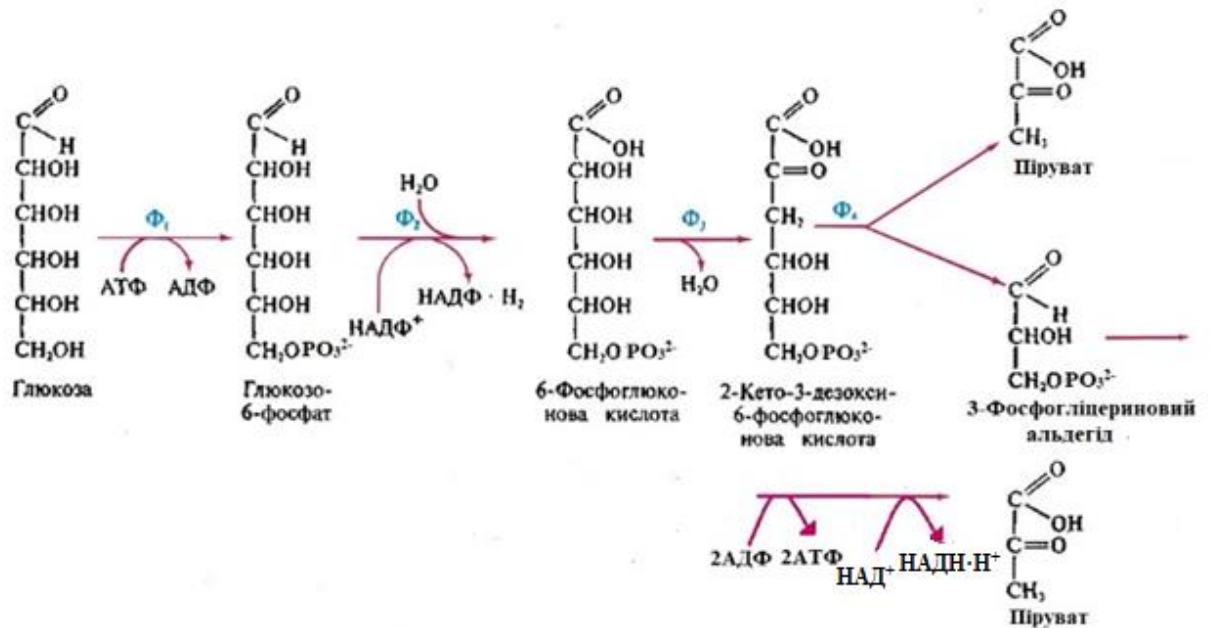
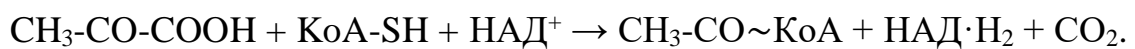


Рисунок 2.1. Схема хімічних перетворень КДФГ-шляху

Піровиноградна кислота окислюється за участі коензиму А до ацетил-КоА. В даному процесі приймає участь піруватдегідрогеназа:



Ацетил-Коа є вихідним субстратом для циклу Кребса, ферменти якого також були виявлені у *Rhizobium meliloti* [10].

Реакції циклу трикарбонових кислот наведені на рисунку 2.2.

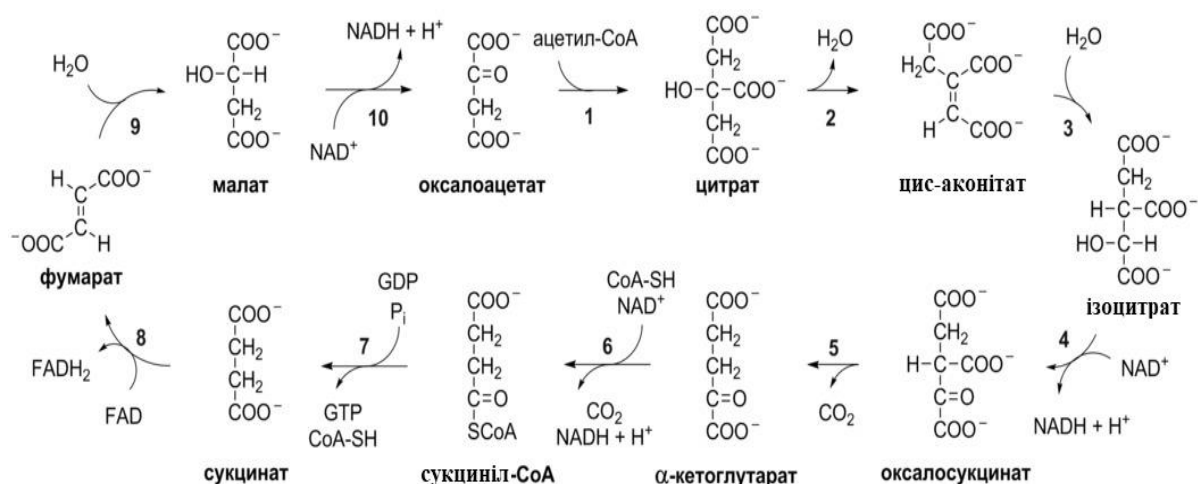


Рисунок 2.2. Реакції циклу трикабонових кислот

Першим етапом є утворення цитрату, що відбувається при взаємодії ацетил-КоА з оксалоацетатом за участі цитратсинтази (1). Далі відбувається дегідратація лимонної кислоти з утворенням проміжної сполуки цис-аконітової кислоти (2). Ізоцитрат утворюється внаслідок приєднання молекули води за участі ферменту аконітази (3). Третім етапом є окиснення ізоцитрату до α-кетоглутарату. Ізолимонна кислота дегідрується в присутності НАД-залежної ізоцитратдегідрогенази з утворенням проміжної сполуки оксалосукцинату (4). В ході ізоцитратдегідрогеназної реакції ізоцитрат одночасно декарбоксилюється (5). В ході реакції (6) відбувається окислювальне декарбоксилювання α-кетоглутарату з утворенням високоенергетичного сукциніл-КоА за участі α-кетоглутаратдегідрогеназного комплексу. В якості акцептора електронів виступає НАД⁺. У ході реакції (7) сукциніл-КоА під дією сукциніл-КоА-синтетази перетворюється в сукцинат. Одночасно відбувається утворення високоенергетичного фосфатного зв'язку ГТФ за рахунок тіоефірного зв'язку сукциніл-КоА. В результаті реакції (8) сукцинат дегідрується в фумарову кислоту. Реакція каталізується сукцинатдегідрогеназою, в молекулі якої з білком зв'язаний кофермент ФАД, який відновлюється до ФАДН₂. Реакція (9) здійснюється під впливом фермента фумарази. Продуктом реакції є L-малат. В останній реакції (10) L-

малатдегідрогеназа каталізує окислення L-малату до оксалоацетату з відновленням НАД⁺ [18].

В результаті КДФГ-шляху і циклу трикарбонових кислот утворюються відновлювальні еквіваленти, що використовуються для мембранного фосфорилування – 1 НАДФ·Н₂ і 1 НАД·Н₂ в КДФГ-шляху, 2 НАД·Н₂ в піруватдегідрогеназній реакції та 6 НАД·Н₂ і 2 ФАДН₂ в результаті циклу Кребса. Процес дихання відбувається на електронтранспортному ланцюгу за рахунок переносу електронів і протонів від відновлювальних еквівалентів до акцептору електронів – О₂. Вивільнена в цьому процесі енергія перетворюється в АТФ.

Перший етап дихального ланцюгу каталізується специфічними дегідрогеназами, використовуючи відновлені кофактори, як донори електронів. Електрони передаються до пулу хінонів, формуючи хіноли, які потім окиснюються двома альтернативними шляхами. За першого шляху електрони прямо переносяться на кисень. Даний шлях каталізується хіноламі. За другого шляху електрони спершу переносяться на цитохром *c*, і відновлений цитохром *c* потім окиснюється цитохром *c* оксидазами. Останній перетворює О₂ до Н₂О. Окиснення хінолу і відновлення цитохрому *c* каталізується комплексом цитохром *bc* 1. Перший шлях використовує дві зв'язані з мембраною оксидоредуктази. Другий шлях – три. Для дихального ланцюга характерні розгалуження. Розгалуження відбуваються після хінолового пулу, та/або після *bc* 1 комплексу. В першому випадку електрони можуть перетікати від одної до іншої з двох різних хінольних оксидаз, або між хінольними оксидазами і *bc* 1 комплексом. В другому випадку, *bc* 1 комплекс розподіляє електрони між альтернативними *c*-цитохромами, які потім виступають в ролі субстратів різних цитохром *c* оксидаз. Розгалужені дихальні ланцюги мають більше, ніж одну термінальну оксидазу для відновлення О₂ до Н₂О. Для кожної перенесеної пари електронів чотири протона транслюкуються специфічними дегідрогеназами (комплекс I), два протони транслюкуються при відновленні і повторному окисненні хінонів (в *bc* 1 комплексі або на

термінальних оксидазах). Чотири додаткових протона транслюються на термінальних оксидазах. При мембранному потенціалі 150 мВ приблизно 50% енергії зберігається у вигляді рушійної сили протону і може використовуватися для генерації АТФ [19].

2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Готовий препарат сухого нітрагіну містить 5 млрд життєздатних бактерій *Rhizobium meliloti* Л5-1/24 на 1 г. Число клітин сторонніх мікроорганізмів від числа бульбочкових бактерій не перевищує 3%. Масова доля вологи – від 2,0-10,0 %.

2.4. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Бобово-ризобіальний симбіоз, що представляє собою азотфіксуючу систему, включає два головних компоненти – рослинний і бактеріальний – функціональна активність яких забезпечує ефективність рослинно-мікробних взаємовідносин. Вплив мікроорганізмів виявляється в покращенні живлення рослин і активізації ростових процесів. Ризобактерії також відіграють важливу роль у захисті мікроорганізмів від дії абіотичних стресових факторів і покращенні фізико-хімічних властивостей ґрунту. Непрямою дією симбіозу є пригнічення активності фітопатогенів і індукування системи стійкості у рослин [20].

Насіння люцерни обробляють препаратом *Rhizobium meliloti* Л5-1/24 перед посівом. Бульбочкові бактерії утворюють симбіоз, проникаючи в корені рослин та утворюючи бульбочки. Такий симбіоз відрізняється строгою специфічністю.

Інфекція кореня ризобіями це багатоетапний процес, який ініціюється передінфекційними подіями в ризосфері. Бактерії відповідають позитивним хемотаксисом на виділення ексудатів коренями і рухаються до сайтів на коренях бобових. *Rhizobium meliloti* реагують на флаваноїди, що містяться в ексудатах, які відіграють роль хемоатрактантів та індукторів генів нодуляції. Ці гени необхідні для вироблення бактерійних сигнальних молекул – Nod-

факторів, які запускають розвиток бульбочок на рослині-хазяїні. Nod-фактори – це ліпохітоолігосахариди, які мають специфічні групи, що розпізнаються рецепторами рослини-хазяїна типу LysM. Ці рецептори необхідні для розвитку бульбочок та бактеріальної інфекції [21].

Внаслідок розпізнавання ризобії прикріплюються до поверхні кореня. Для ризобій первинними об'єктами зараження є молоді кореневі волоски. Після адгезії бактерій, відбувається місцевий гідроліз клітинної стінки. Бактерії потрапляють в корені через ці сайти гідролізу. Проникнення відбувається шляхом інвагінації плазматичної мембрани. Клітини рослини-хазяїна реагують накопиченням матеріалу клітинної стінки у вигляді трубки. Трубка, заповнена проліферуючими бактеріями, стає інфекційною ниткою. Окрім утворення інфекційної нитки, бактерії стимулюють поділ клітин кори кореня, що сприяє утворенню зачатку бульбочки [22]. В цитоплазмі тетраплоїдних клітин палички ризобій перетворюються в бактероїди – крупні клітини неправильної форми. Зачатки бульбочок диференціюються в азотфіксуючі кореневі бульбочки, що забезпечують мікроаеробні умови для функціонування чутливого до кисню ферменту нітрогенази.

У сформованих бульбочок люцерни (рисунок 2.3) виділяють меристему, яка знаходиться в апікальному регіоні (зона I). В цій зоні відбувається активний ріст внаслідок поділу клітин. Інфекційна нитка вивільняє бактерії в субмеристематичні клітини, які формують 12-15 шарів клітин інфекційної зони (зона II). Ці клітини поступово диференціюються в азотфіксуючі симбіотичні клітини в зоні III.

Бактероїди сприяють виробленню пігменту леггемоглобіну, що обумовлює рожеве забарвлення бульбочок. Леггемоглобін виконує функцію постачання бактероїдів киснем, полегшуючи його дифузію через клітини рослин і регулюючи рівень парціального тиску кисню. Леггемоглобін складається з гемового фрагмента та одного поліпептиду (глобіну). Послідовність амінокислот для глобіну залежить від виду бобових, тоді як гемовий фрагмент залишається постійним незалежно від бактеріального

штаму та видів бобових. Леггемоглобін утворюється всередині клітинної цитоплазми інфікованих клітин, а не всередині перибактероїдної мембрани, що оточує бактерії. Він метаболічно деградується різними протеазами до холеглобіну та білівердину. Синтез леггемоглобіну починається одразу після початку нодуляції та до синтезу нітрогенази.

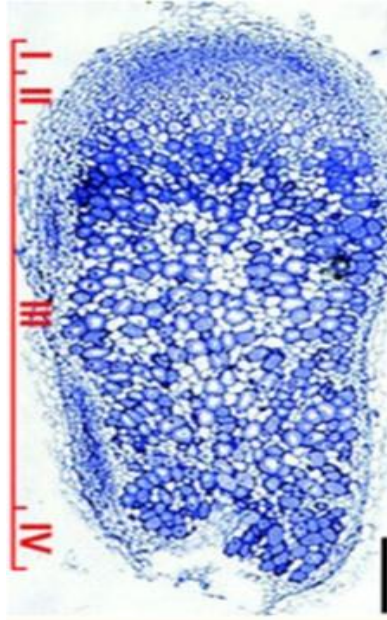
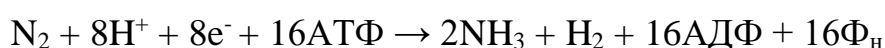


Рисунок 2.3. Структура бульбочок люцерни

З хімічної точки зору зв'язування молекулярного азоту – це відновлювальний процес, реакція якого наведена нижче:



Ця реакція в клітині відбувається за участі ферменту нітрогенази. Нітрогеназа – це мультифермент, який складається з білків трьох типів (α , β , γ) і двох кофакторів: МоFe-кофактор і Fe-кофактор. Ці компоненти організовані в дві субодиниці: велику - динітрогеназу ($\alpha_2\beta_2$), до складу якої входить МоFe-кофактор, і малу - редуктазу динітрогенази (γ_2), що містить Fe-кофактор (рисунок 2.4) [23].

Молекулярна маса МоFe-білка коливається від 200 до 250 кДа. В одній молекулі ферменту може міститися два атома молібдену, 28-34 атомів заліза і 18-24 атомів сірки. За сучасними уявленнями, цей білок здійснює зв'язування і відновлення азоту. Fe-білок має молекулярну масу в межах від 50 до 70 кДа

і також містить атоми заліза і сірки. Ця субодиниця бере участь в транспорті електронів від їх донорів (ферредоксин) на MoFe-білок. За розрахунками для відновлення однієї молекули N_2 потрібно не менше 12 молекул АТФ. Реальні витрати енергії значно вище і становлять 25-35 молекул АТФ.

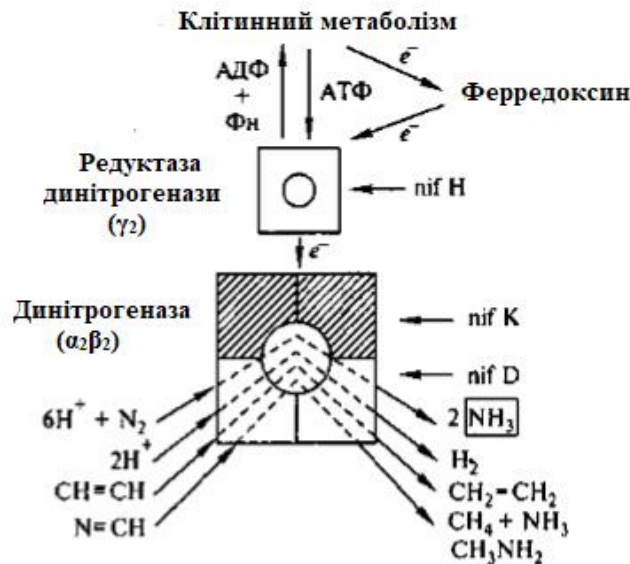


Рисунок 2.4. Структура і функції нітрогенази

Однією з умов успішної азотфіксації є підтримання низької концентрації молекулярного кисню (10-30 нмоль/л). Молекулярний кисень акцептує електрони з розчинних переносників електрон-транспортного ланцюга, що функціонують в процесі азотфіксації, в результаті чого виснажується пул відновлених донорів електронів, необхідних для біосинтезу. Це негативно впливає на обидва білка нітрогенази, але більш чутливий до кисню Fe-білок.

У бактерій *Rhizobium* зниження концентрації кисню досягається завдяки дії декількох механізмів: утворення дифузійного бар'єру - шару тісно прилеглих один до одного клітин в кортексі бульби, а також синтезу в інфікованих клітинах леггемоглобіну [24].

Симбіотична азотфіксація *Rhizobium meliloti* здійснює прямий вплив на ріст і розвиток рослин люцерни, оскільки азот є життєво важливим елементом для росту рослин; він необхідний для синтезу макромолекул, таких як

амінокислоти, нуклеїнові кислоти та хлорофіл. Також *R. meliloti* здатний підвищувати доступність фосфору у ґрунті для рослин за рахунок його солюбілізації низькомолекулярними органічними кислотами, які виділяють *R. meliloti*. Ще одним впливом на ріст рослин є здатність *R. meliloti* продукувати гібереліни, дефіцит якого призводить до карликовості рослин.

Непрямим впливом *R. meliloti* на ріст і розвиток рослин є біологічний контроль захворювання рослин. Поліпшення стану здоров'я рослин опосередковується двома різними екологічними механізмами: за рахунок антагонізму до шкідників та збудників хвороб та за рахунок стимулювання захисних сил рослин. Доведено, що *R. meliloti* здатні інгібувати *Phoma medicaginis* – збудників чорного стебла у люцерни [25].

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

3.1.1. Наявність генетичних карт продуценту або типового представника групи

Rhizobium meliloti (*Sinorhizobium meliloti*) є предметом значних генетичних, біохімічних і метаболічних досліджень. Диким типом та модельним штамом досліджень вважається *R. meliloti* 1021. Геном *R. meliloti* складається з трьох репліконів: один великий реплікон розміром 3,65 Мб і два менших реплікона – pSymA і pSymB, розмірами 1,35 і 1,68 Мб, відповідно. Припускається, що в геномі *R. meliloti* є 6204 протеїнкодуєчих гени. Функція визначена для 59,7% генів *R. meliloti* на основі порівнянь з базами даних, тоді як 8,2% продуктів генів *R. meliloti* не мають збігу з базами даних. Геном *R. meliloti* не має великої кількості повторів. Але геном містить багато прадавніх дуплікацій, тому що 42% генів належать до 548 родин паралогів. Такий високий рівень паралогії передбачає, що розмір геному *R. meliloti* був обмежений під час еволюції, полегшуючи набуття нових адаптивних функцій для життя в ґрунті і для симбіозу.

Інсерційні послідовності (IS-елементи) і фагові послідовності складають 2,2% геному, але їх розподіл варіюється. Їх загальна чисельність вище в pSymA, особливо поблизу симбіотичних генів, що є особливістю симбіотичних плазмід і регіонів інших ризобій [26].

Картування 447 маркерів на хромосомі *R. meliloti* 1021 привело до позиціонування 118 генів - 40 окремих генів і 78 генів, згрупованих в 23 оперона. Карта хромосоми *S. meliloti* 1021 (рисунок 3.1), представлена у вигляді шести лінійних суміжних частинах приблизно по 600 кб.

Зліва представлені положення маркера гена, справа - розташування маркерів ДНК-маркуючих сайтів. Маркери з вирівняними послідовностями розташовані на одній лінії. Відстань між кожним маркером оцінюється в приблизно 9 кб. Картовані гени та їх функції наведені у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Картовані гени на хромосомі *R. meliloti* 1021 та їх функції

Гени	Функція або продукт	Гени	Функція або продукт
1	2	3	4
<i>aatA</i> і <i>aatB</i>	Аспартат аміотрасфераза А та В	<i>actA-phrR-act206</i>	Гени необхідні для кислотної толерантності
<i>actS-actR</i>	Двокомпонентна регуляторна система, що необхідна для кислотної толерантності	<i>adenine DNA methyltransferase betICBA</i>	Синтез гліцин бетаїну
<i>cgmA</i>	Невідома	<i>cheY1AWRBY2-orf1-orf2-orf9</i>	Оперон хемотаксису
<i>chvI-chvG</i>	Двокомпонентна регуляторна система	<i>cyaA</i> і <i>cya2</i>	Аденілаза А і 2
<i>cysHJKL</i>	Оперон цитохром с біогенезу	<i>degP</i>	Протеаза
<i>delta-ALA synthetase</i>	δ-амінолевуленат синтетаза	<i>dgkA</i>	Діацилгліцерол кінза
<i>dme</i>	НАД-залежна декарбоксилююча малатдегідрогеназа	<i>dnaA</i>	Білок ініціації хромосомної реплікації
<i>exoD</i>	ЕхоD білок для проникнення в бульбочку	<i>exoR</i>	Можливий транскрипційний регулятор
<i>exoS</i>	Гістидинкіназний сенсорний білок ЕхоS	<i>flaA-flaB</i>	Гени флагеліну
<i>fliI-flgF-motA-fliM</i>	Оперон джгутика	<i>fliP</i>	Білок, що бере участь в утворенні джгутиків
<i>ftsQ-ftsA-ftzZ</i>	Білки, що приймають участь в діленні клітини	<i>ftzZ2</i>	Білки, що приймають участь в діленні клітини
<i>glnA-glnB</i>	Глутамінсинтетаза I, РІІ регуляторний білок	<i>gltX-lysS</i>	Глутаміл-тРНК синтетаза, лізил-тРНК-синтетаза
<i>gyrA</i>	Субодиниця А ДНК-гірази	<i>helO</i>	Хеліказа
<i>hsp70</i>	Білок теплового шоку	<i>ilvC</i>	Ізомероредуктаза ацетогідроксикислоти
<i>katA</i>	Каталаза	<i>lon</i>	Протеаза
<i>leu-tRNA</i>	Перенесення РНК-лейцину	<i>mucR</i>	Білок регуляції транскрипції

Продовження таблиці 3.1

1	2	3	4
<i>mraY-murD</i>	UDP-N-ацетилмураміл-L-аланін-D-глутамат- L-лізин лігаза	<i>ndvA</i>	Білок, що приймає участь в синтезі β -(1-2)-глюкану
<i>ndvB</i>	Білок, що приймає участь в синтезі β -(1-2)-глюкану	<i>nolR</i>	Білок нодуляції NolR
<i>ntrA</i>	σ -54 фактор РНК-полімерази	<i>ntrB-ntrC</i>	Двокомпонентний регуляторний білок
<i>nuoABC</i>	НАДН-убіхінон оксидредуктаза	<i>pckA</i>	Фосфоенолпіруват карбоксикіназа
<i>pckR</i>	Регулятор експресії <i>pckA</i>	<i>phaABCDEFG</i>	K ⁺ система ефлюкса, що приймає участь в регуляції рН
<i>phbC</i>	Полі- β -гідроксибутират синтаза	<i>phoU-phoB</i>	Фосфат-регуляторний білок
<i>pmi</i>	Фосфоізомераза	<i>podA</i>	Піруват ортофосфат дикіназа
<i>pro-tRNA</i>	Транспорт РНК-проліну	<i>putA</i>	Пролін дегідрогеназа
<i>recA-alaS</i>	RecA білок; аланіл-тРНК-синтетаза	<i>recF-orfA-pit</i>	Фосфат транспортний білок
<i>rkpK-orfI</i>	UDP-глюкозодегідрогеназа; UDP-епімераза глюкуронової кислоти	<i>rpsA</i>	30S рибосомальний білок S1
<i>sigA-tdh</i>	σ -фактор; треонін дегідрогеназа	<i>soxADB-glxABCD-glnT</i>	Саркозооксидаза; оперон глютамінсинтетази III
<i>suhR</i>	groH супресор	<i>tatA</i>	Тирозин амінотрансфераза
<i>tme</i>	НАДФ-залежний малат фермент	<i>trpE</i>	Антранілат синтаза
<i>ureABC</i>	Уреаза	<i>4_Rme</i>	σ -54 залежний транскрипційний активатор
<i>surE-pcm-bioS-lppB</i>	Можливий оперон виживання	-	-

Загалом геном хромосоми *R. meliloti* 1021 містить 85,8% протеїнкодуєчих регіонів, з них 7,2% регуляторних генів, 5% видоспецифічних генів [27].

Гени, які необхідні для симбіозу, розташовані на всіх трьох репліконах, але частіше зустрічаються на мегаплазмідах. Гени, що приймають участь в нодуляції та азотфіксації, розташовані на pSymA, тоді як гени, потрібні для

синтезу позаклітинних полісахаридів і інших симбіотичних функцій, розташовані на pSymB. Ці два генетичних елемента мають як хромосомні, так і плазмідні характеристики. Обидві плазмиди на три порядки більше, ніж більшість клонуєчих векторів, і містять деякі конститутивні гени. З іншого боку, мегаплазмиди можна вилучити з клітини, не впливаючи на ріст і розмноження (принаймні, в пермісивних умовах). Крім того, мегаплазмиди можна переносити і підтримуватися принаймні в *Agrobacterium*.

Картування плазмиди pSymA з використанням 192 маркерів, включаючи 157 ДНК-маркуючих сайтів і 33 генетичних маркери (14 окремих генів, 15 оперонів і чотири послідовності вставки) представлено на рисунку 3.2. Припускаючи випадковий розподіл маркерів, середній інтервал між ними 7 кб.

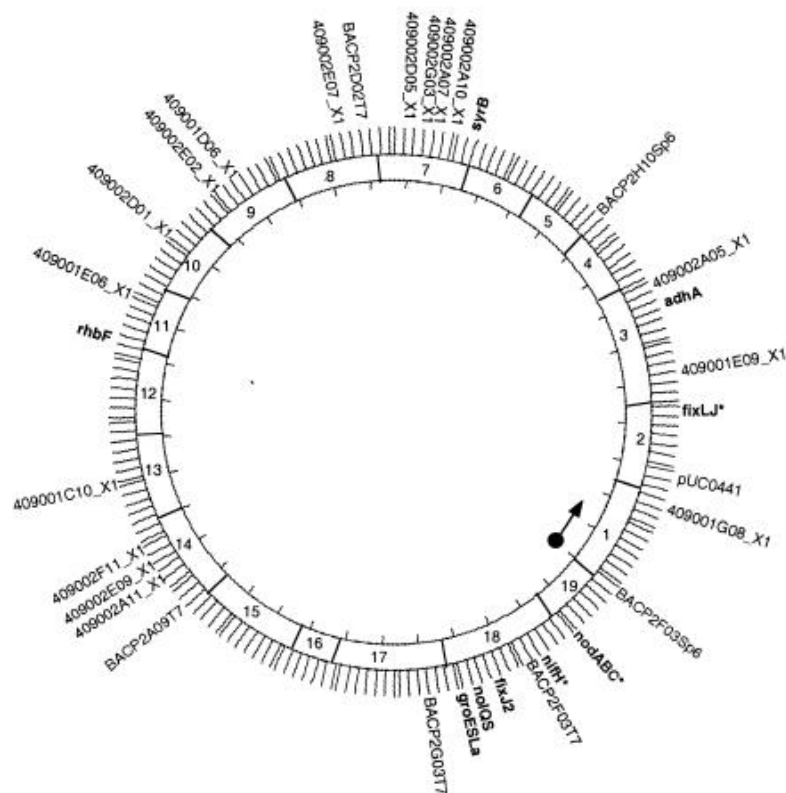


Рисунок 3.2. Генетична карта плазмиди pSymA *R. meliloti* 1021

Загалом протеїнкодуєчі регіони складають 83,2% геному плазмиди, з них регуляторні гени – 10,4%, видоспецифічні гени – 11,5%. Гени нодуляції та азотфіксації згруповані в симбіотичну область, загальна довжина якої

оцінюється в діапазоні від 250 до 300 кб. Решта 1,1 Мб реплікону не містять ніяких відомих симбіотичних генів, крім *syrB*. Картовані гени та їх функції наведені у таблиці 3.2 [28].

Таблиця 3.2. Картовані гени на плазміді pSymA *R. meliloti* 1021 та їх функції

Гени	Функція або продукт	Гени	Функція або продукт
<i>adhA</i>	Алкогольдегідроге наза	<i>fixABCX</i>	Електронтранспорт ний ланцюг до нітрогенази
<i>fixGHIS</i>	Катіон транспортний комплекс	<i>fixJ2T2-fixK2</i>	Транскрипційні активатори
<i>fixKorf151</i>	Транскрипційний активатор	<i>fixNOQP</i>	Бактероїдоксидаза
<i>fixLJT1</i>	Гемопротеїнкіназа; транскрипційний активатор	<i>groESLa</i>	Шаперонін
<i>nifABfdxNfixU</i>	Регуляторний білок азотфіксації; ферредоксинподібний протеїн	<i>nifHDKE</i>	Редуктаза нітрогенази
<i>nifN</i>	редуктаза FeMo- кофактору	<i>nodABCII</i>	Ацетилтрансфераза ; N-ацетилаза; хітинсинтетаза; транспорт <i>nod</i> факторів
<i>nodD1</i>	Активатор <i>nod</i> гену	<i>nodD2</i>	активатор <i>nod</i> гену
<i>nodD3</i>	Активатор <i>nod</i> гену	<i>nodFE</i>	Ацилпереносні білки
<i>nodG</i>	Гіпотетична дегідрогеназа	<i>nodH</i>	Сульфотрансфераза
<i>nodLnoeAB</i>	O- ацетилтрансфераза	<i>nodMnolFGHI</i> <i>nodN</i>	Глюкозоамінсинтет аза; транспорт
<i>nodPQ</i>	АТФ- сульфурилаза- аденозин 5'- фосфосульфат кіназа	<i>nolQS</i>	Невідома функція
<i>nosRZDFY</i>	Білки відновлення оксиду азоту	<i>maturase</i>	Обернена транскриптаза
<i>rhbF</i>	Біосинтез сидерофорів в регулоні ризобактину	<i>syrA</i>	Збільшує вміст екзополісахаридів
<i>syrB</i>	Негативно впливає на експресію <i>syrM</i>	<i>syrM</i>	Активатор <i>nod</i> гену

Мегаплазмідa pSymB довжиною 1,683 кб містить різні генні кластери, що приймають участь у синтезі екзополісахаридів, транспорті C₄-дикарбоксилату і метаболізмі лактози. Гени, розташовані на pSymB, які необхідні для формування азотфіксуючих корневих бульбочок, включають гени транспорту C₄-дикарбоксилату (*dctA*) і фосфату (*phoCDET*) і ген *bacA*. Генетична карта плазміди pSymB представлена на рисунку 3.3.

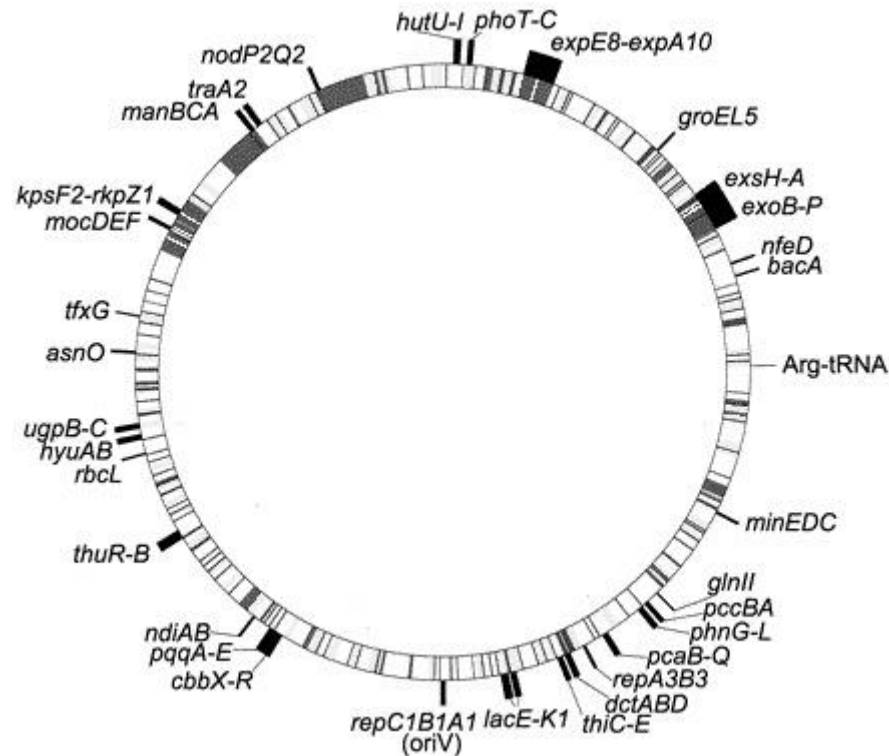


Рисунок 3.3. Генетична карта плазміди pSymB *R. meliloti* 1021

Загалом протеїнкодуєчі регіони складають 88,6% геному плазміди, з них регуляторні гени – 10,5%, видоспецифічні гени – 12,3%.

Картовані гени та їх функції наведені у таблиці 3.3 [29].

Таблиця 3.3. Картовані гени на плазміді pSymB *R. meliloti* 1021 та їх функції

Гени	Функція або продукт	Гени	Функція або продукт
1	2	3	4
<i>repA1B1C1</i>	Оріджин реплікації	<i>minCDE</i>	Можлива роль у розміщенні сайтів клітинного поділу
<i>repA3B3</i>	Розщеплення плазмід	<i>groEL5</i>	Білки теплового шоку

Продовження таблиці 3.3

1	2	3	4
<i>htpG</i>	Білки теплового шоку	<i>exo/exs</i>	Синтез сукциноглікану, галактоглюкану
<i>aroE2</i>	Шикімат-5-дегідрогеназа	<i>glnII</i>	Глутамін синтетаза II
<i>thiCOSGE</i>	Біосинтез тіаміну	<i>thiD</i>	Біосинтез тіаміну
<i>asnB</i>	Аспарагінсинтетаза	<i>asnO</i>	Аспарагінсинтетаза
<i>pccAB</i>	Пропіоніл-КоА-карбоксилаза	<i>bhbA</i>	Метилмалоніл-КоА-мутаза
<i>hutUGHIL</i>	Утилізація гістидину	<i>apaA</i>	Утилізація полі-3-гідроксibuтирату, α -галактоцидів, мелібіози, рафінози
<i>agpL</i>	Утилізація полі-3-гідроксibuтирату, α -галактоцидів, мелібіози, рафінози	<i>agpT</i>	Утилізація полі-3-гідроксibuтирату, α -галактоцидів, мелібіози, рафінози
<i>lacEFGZK</i>	Утилізація лактози	<i>pcaB-pcaF</i>	Білки, що беруть участь в шляху перетворення гідроксифенілпірувата і 4-гідроксибензоату в проміжні сполуки ЦТК
<i>paaGZEDBAX</i>	Багатокомпонентна оксигеназа, що приймає участь в катаболізмі феніл ацетату	<i>phnA</i>	Деградація фосфонатів
<i>phnGHIJKL</i>	Деградація фосфонатів	<i>phnM</i>	Деградація фосфонатів
<i>phoCDET</i>	Деградація фосфонатів	<i>cbbS</i>	Рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксилаза, фосфорибулокіназа
<i>cbbL</i>	Рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксилаза, фосфорибулокіназа	<i>cbbP</i>	Рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксилаза, фосфорибулокіназа
<i>cbbR</i>	Транскрипційний регулятор родини LysR	<i>ackA</i>	Фосфотрансацетилаза і ацетаткіназа
<i>pta</i>	Фосфотрансацетилаза і ацетаткіназа	<i>thuREFGK</i>	Транспортери лактози і мальтози/трегалози
<i>nodP2</i>	Сульфат аденілтрансфераза субодиниця 2	<i>nodQ2</i>	Мультифункціональні химерні білки
<i>nfeD</i>	Приймає участь в азотфіксуючій конкурентності	<i>acrE; acrF</i>	Можливі білки стійкості до акрифлавіну

Вивчення геному *R. meliloti* 1021 показало, що його геном складається з трьох репліконов з характерними структурними і функціональними

особливостями. Хромосома *R. meliloti* є типовою для аеробних і гетеротрофних бактерій. Наявність *pSymB* значно розширила метаболічні можливості бактерій, дозволяючи їм метаболізувати більшу різноманітність сполук, що зустрічаються в ґрунті або в рослинній ризосфері. Набуття здатності до синтезу екзополісахаридів також покращило колонізуючий потенціал бактерій. Набуття *pSymA* дозволило цим мікроорганізмам метаболізувати різноманітні форми азоту, в тому числі молекулярний.

3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу

Цільовим продуктом культивування є біомаса бактерій *R. meliloti*. Для її напрацювання в якості джерела карбону в середовищі для культивування використовується глюкоза, що метаболізується у шляху Ентнера-Дудорова. Ключовими ферментами шляху є фосфоглюконатдегідратаза та альдолаза. Ферменти шляху Ентнера-Дудорова кодуються в одному локусі. Локус містить ген *edd*. Вважається, що він кодує фосфоглюконатдегідратазу. Локус містить ген *zwf*, який імовірно кодує глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу. Ген, що кодує альдолазу, експериментально не ідентифіковано, але є два імовірних гени на хромосомі (*eda1*, *eda2*) [10].

Піровиноградна кислота окислюється за участі коензиму А до ацетил-КоА. В даному процесі приймає участь піруватдегідрогеназа. Гени, що кодують комплекс піруватдегідрогенази *pdhAB* розташовані на хромосомі. В умовах культивування піруват здатний індукувати *pdhAB*. Кінетика індукції піруватом була досліджена вимірюванням рівнів *pdhAB* РНК в різний час після додавання пірувату. РНК були екстраговані з клітин через 0, 5, 15, 30 і 60 хв після додавання пірувату до мінімального середовища, що містить сукцинат в якості джерела вуглецю. Індукція експресії *pdhAB* спостерігалася вже через 5 хв після додавання пірувату. Отже, індукція експресії *pdhAB* піровиноградною кислотою відбувається швидко. Індукція піруватом також спостерігалася у *E. coli*. В цьому випадку чутливий до пірувату репресор, PdhR, регулює експресію гена *pdh*. PdhR репресує транскрипцію *pdh* шляхом зв'язування з

сайтом паліндромного оператора. Репресія антагонізується піруватом, як коефектором. Можливо, що гомолог PdhR існує в *R. meliloti* [30].

Ацетил-КоА є вихідним субстратом для циклу Кребса, ферменти якого також були виявлені у *Rhizobium meliloti*. Були ідентифіковані гени, що кодують ферменти циклу Кребса в *Rhizobium meliloti*. Цитратсинтаза, аконітаза і ізоцитратдегідрогеназа кодуються *gltA*, *acnA* і *icd* відповідно.

Взаємозалежність шляху Ентнера-Дудорова та циклу Кребса вказує на необхідність строгої регуляції ключових метаболічних розгалужень. У *Rhizobium meliloti* це досягається частково за допомогою регулятора транскрипції LacI-типу PckR, який регулює експресію гена *pckA*, що кодує фермент фосфоенолпіруват карбоксикіназу. Рівень експресії *pckA* є низьким під час росту з глюкозою або лактозою і високим під час росту з сукцинатом або арабінозою.

Запропонована модель регуляції за допомогою PckR, в якій катаболізм гліколітичних сполук спричиняє підвищення концентрації ефекторної молекули, яка зв'язується з PckR і знижує спорідненість PckR до його ДНК-зв'язуючого мотиву (рисунк 3.4). Коли концентрації ефектора значно знижуються, наприклад, під час катаболізму глюконеогенних субстратів, PckR дисоціює від свого ефектора і приєднується до ДНК-зв'язуючого мотиву. Якщо сайт зв'язування перекриває промотор або сайт старту транскрипції, це призводить до репресії транскрипції. Індукція транскрипції відбувається, якщо є два сайти зв'язування, розташовані вище мотивів промотора. З огляду на розташування сайтів зв'язування в негативно регульованих промоторах (гени *zwf-pgl-edd*, *eda2*), зв'язування PckR імовірно порушує зв'язування або просування РНК-полімерази, тим самим знижуючи експресію цих генів.

На рисунку 3.4 (А) зображує випадок, коли внутрішньоклітинні концентрації ефектора високі, наприклад, під час росту з глюкозою. PckR зв'язаний з ефектором і дисоційований від його сайтів зв'язування з ДНК. Це призводить до високої транскрипції негативно регульованих промоторів – генів, що відповідають за синтез ферментів шляху Ентнера-Дудорова. (В)

зображує випадок, коли внутрішньоклітинні концентрації ефектора низькі, наприклад, під час росту з сукцинатом, PckR не зв'язаний з ефектором, а зв'язаний з сайтами ДНК. Це призводить до низької транскрипції негативно регульованих промоторів [31].

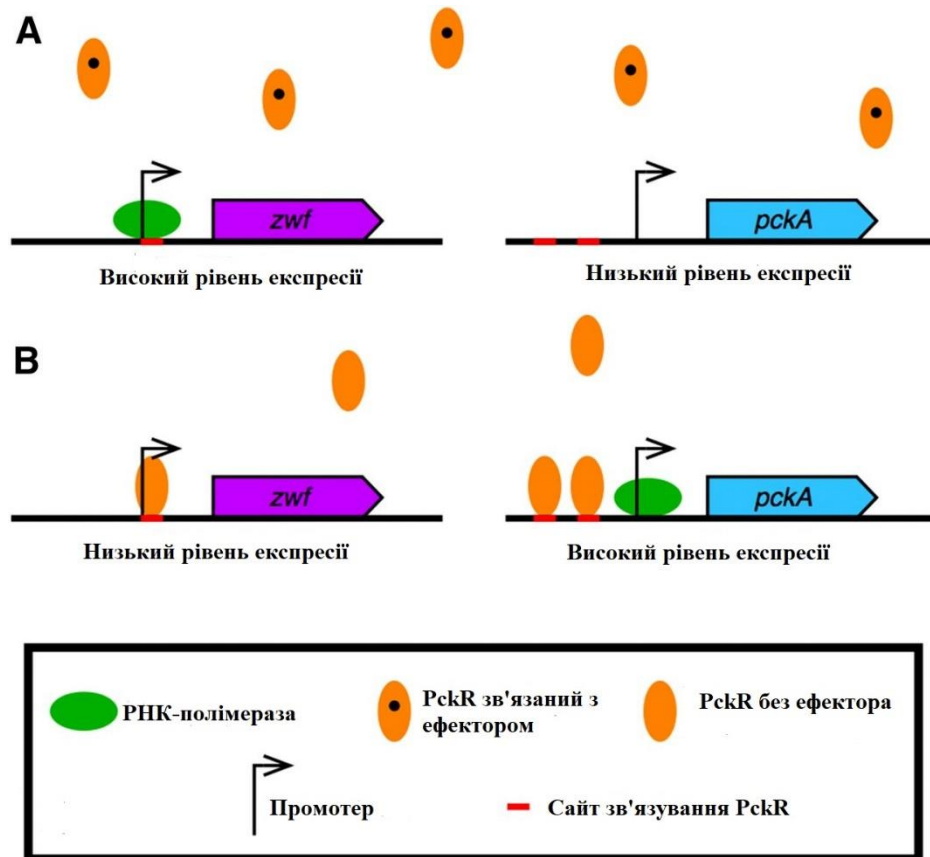


Рисунок 3.4. Запропонована модель регуляції за допомогою PckR

В результаті КДФГ-шляху і циклу трикарбонових кислот утворюються відновлювальні еквіваленти, які далі використовуються в процесі дихання. Компонент дихального ланцюгу цитохром с оксидаза типу *cbb₃* з високою спорідненістю до кисню кодується двома наборами дуплікованих генів *fixNOQP* на плазміді pSymA. І pSymA, і хромосома несуть гени, що кодують НАДН-убіхінон дегідрогенази. На плазміді pSymA також є гени, що кодують дегідрогенази. У *S. meliloti* експресія *fixNOQP* регулюється головним чином через O₂-чутливий каскад, що складається з продуктів генів *fixL* і *fixJ*; цей

каскад активує експресію гена *fixK*, що кодує транскрипційний активатор. Це призводить до експресії оперона *fixNOQP* [32].

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

Для створення запропонованого штаму *Rhizobium meliloti* Л5-1/24 використовується такий метод селекції, як відбір.

Головним критерієм для відбору штамів ризобій є ефективність. Ефективність штамів ризобій визначають за допомогою двох кількісних показників - конкурентна здатність та симбіотична ефективність.

Конкурентна здатність – це здатність досліджуваного штаму ризобій формувати бульбочки на коренях рослини-хазяїна в присутності інших штамів бактерій.

Конкурентну здатність можна оцінити за допомогою серологічного методу. Окремі штами або групи штамів ризобій мають свою специфічну антигенну структуру. Ця властивість штамів використовується для їх серологічної ідентифікації. Широке застосування в серологічних дослідженнях з бульбочковими бактеріями знаходить метод преципітації в агарі, який є найбільш зручним і надійним. Для цього здійснюють посів інокульованого насіння в ґрунт, що містить спонтанні раси бульбочкових бактерій того ж виду, що і досліджуваний штам, або здійснюють інокуляцію насіння штамами різної антигенної структури. Сформовані бульбочки стерилізують, роздавлюють в фізіологічному розчині та здійснюють посів на чашки Петрі. Змив з цих чашок використовують як антигени для серологічної ідентифікації культури. При позитивній реакції між штамом та антитілом на агарі формується лінія преципітації. Кількісно показник визначається відношенням між кількістю бульбочок, утворених досліджуваним штамом, та загальною кількістю бульбочок.

Також конкурентну здатність оцінюють методом генетичного маркування. Досліджувані штами ризобій культивують на середовищах з підвищеними концентраціями антибіотиками. При цьому відбувається

адаптація штамів до підвищених доз антибіотику. При виділенні таких мутантів з бульбочок їх можна порівняно легко відрізнити від інших штамів за рахунок їх росту на середовищах з підвищеними дозами антибіотику.

Симбіотична ефективність – здатність створювати ефективний симбіоз і підвищувати продуктивність бобових культур. Цей показник можна оцінювати за допомогою польових методів, аналізуючи кількість та масу бульбочок, приріст наземної маси та коренів рослин, урожайність та якість зерна. Для статистичної обробки даних використовують стандартні методи дисперсного аналізу та аналізу параметрів генеральної сукупності.

Проте найбільш показовою характеристикою симбіотичної активності є їх нітрогеназна активність. Цей показник дає можливість отримати відносно об'єктивні показники активності бульбочкових бактерій. На даний момент для визначення активності азотфіксації широко використовують ацетиленовий метод. Для визначення азотфіксуючої активності даним методом культури бульбочкових бактерій інкубують в присутності ацетилену в герметично закритих посудинах і періодично визначається кількість утвореного етилену за допомогою газової хроматографії [33].

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Запропонований штам *Rhizobium meliloti* Л5-1/24 був отриманий шляхом селекції більш ефективних варіантів популяції із культури *Rhizobium meliloti* Л5-1 (рисунок 3.5). Відбір проводили за ознаками азотфіксуючої активності та конкурентної здатності.

Штами бульбочкових бактерій інкубували на агаровому середовищі Мазе протягом 24 годин при температурі 28°C.

Азотфіксуючу (нітрогеназну) активність штамів оцінювали ацетиленовим методом. Для цього бактерії інкубували на агаровому середовищі такого складу (г/л): K_2HPO_4 -1,0; $MgSO_4$ – 0,3; сахароза – 2,0; бобовий відвар – 50; рН 7,0. Мікроорганізми вирощували в закритих ватними пробками флаконах. Для ініціації росту додавали мінімальну кількість джерела зв'язаного азоту (0,0001-0,005% дріжджового екстракту). В кінці

інкубаційного періоду ватяну пробку замінювали стерильною гумовою пробкою. Газоподібний ацетилен збирали у витяжній шафі наступним чином. В пробірку, наполовину заповнену 15 мл води, додавали невелику кількість (близько 1 г) карбїду кальцію. Пробірку закривали пробкою з отвором, через який вона за допомогою гумової трубки з'єднувалась з хімічною склянкою з водою. Ацетилен вводили в посудину з культурою через гумову пробку до концентрації 10% (за об'ємом). Через різні проміжки часу інкубації відбирали проби газу по 1 мл з ємності з культурою і перевіряли наявність етилену методом газової хроматографії. Азотфіксуючу активність визначали по відновленню ацетилену в етилен методом газової хроматографії. Нітрогеназну активність виражають в нмоль C_2H_4 /год/1 млн. бульбочкових бактерій.

Конкурентну здатність визначали методом генетичного маркування. Досліджуваний штам культивували на мінерально-рослинному середовищі (МРС) з поступовим підвищенням дози антибіотика (стрептоміцину) (від 20 до 1000 од/мл). Отримані резистентні варіанти використовували для проведення вегетаційних досліджень. Обробляли 100 насінин. Далі вивчали конкурентну здатність (str^r) - мутантів бульбочкових бактерій люцерни. У стерильні чашки Петрі розливали середовище МРС без антибіотика і окремо таке ж середовище з 1000 од. стрептоміцину на мл середовища. Склад середовища МРС, (г/л): K_2HPO_4 -0,5; KH_2PO_4 -0,5; $MgSO_4$ -0,1; $CaSO_4$ -0,1; $NaCl$ -0,2; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$ - сліди; манїт або глюкоза-20,0; соєве борошно-10,0; рН 6,8-7,0. Бульбочки, взяті з коренів, у віці не менше 5 тижнів, стерилізували і поміщали в стерильну чашку Петрі з водою. На 2 чашки Петрі з стрептоміцином (1000 од/мл) і 1 чашку без антибіотика (контроль) стерильно розмістили бульбочки і роздавили, роблячи поверхневий мазок. Попередньо на чашки нанесли розмітку на 25 гнізд, на чашці аналізували 25 бульбочок. Інкубували чашки протягом 7-10 днів. Потім підраховали кількість бульбочок, що дали ріст на звичайному середовищі і середовищі з стрептоміцином. Результат розраховали за формулою:

$$KC\% = N_{str} \cdot 100 / N_0,$$

де N_{str} – кількість бульбочок, що дали ріст на середовищі з стрептоміцином,
 N_0 – кількість бульбочок, що дали ріст на звичайному середовищі [34].

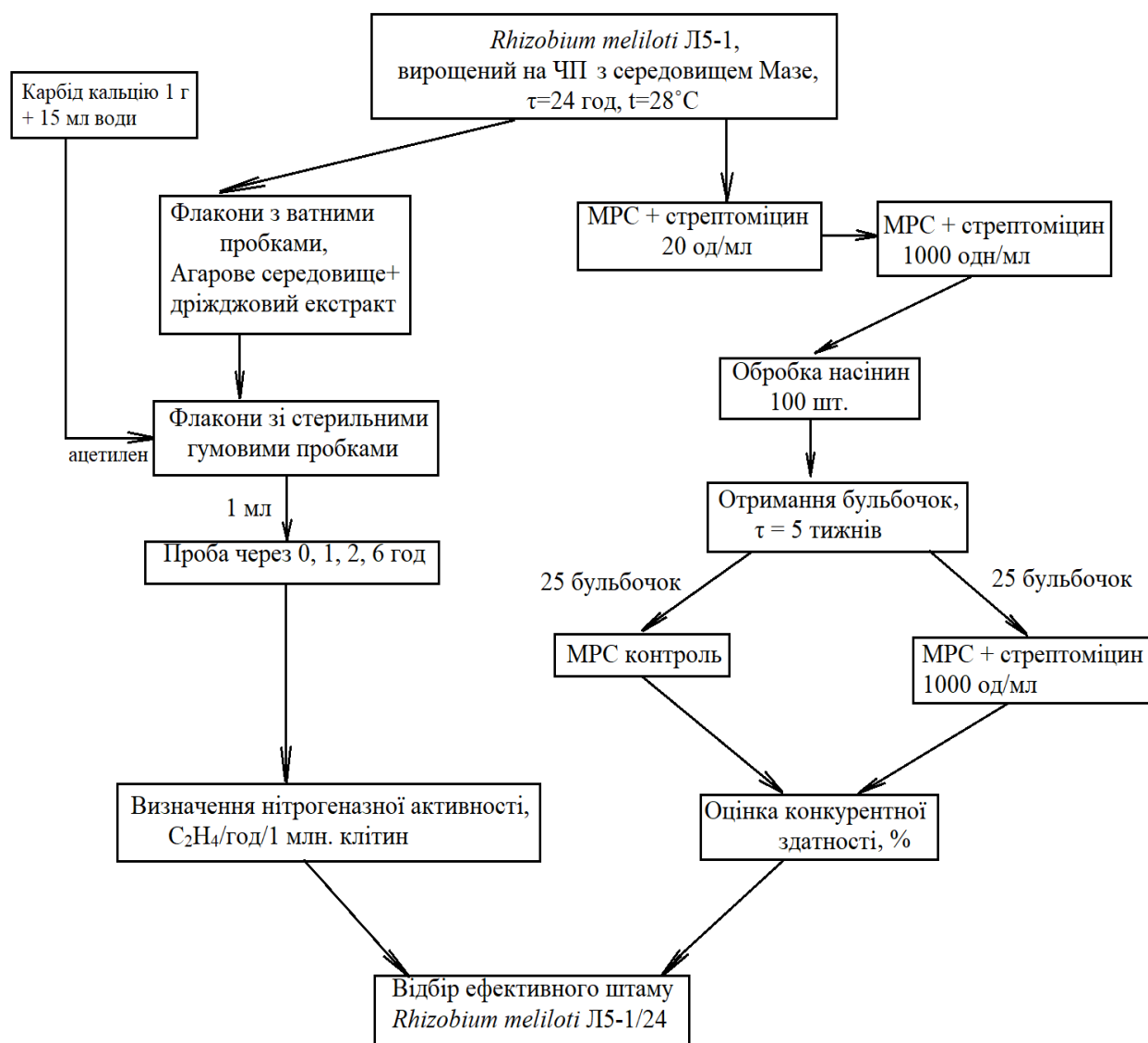


Рисунок 3.5. Блок-схема отримання штаму *Rhizobium meliloti* Л5-1/24

Таким чином, штам *Rhizobium meliloti* Л5-1/24 був отриманий шляхом селекції найбільш ефективних варіантів популяції із культури *Rhizobium meliloti* Л5-1 за азотфіксуючою властивістю та конкурентоспроможністю. Селекціонований штам характеризується кращими показниками продуктивності зеленої маси люцерни, збільшуючи схожість насіння на 4,3 %, вміст сирого протеїну на 6%, у порівнянні з вихідним штамом Л5-1.

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Характеристика готової продукції здійснюється згідно з власним проєктом ТУ У 20.2 – XXXXXXXXX - 001 : 2020 Продукція мікробіологічна. Біодобриво нітрагін. Цей проєкт був розроблений відповідно до ДСТУ - Н 1.3 : 2015 та на заміну ГОСТ Р 57643-2017.

Нітрагін сухий – бактеріальне добриво, отримане на основі активних штамів культури бульбочкових бактерій *Rhizobium*, специфічних для кожного виду бобових культур, використовується в сільському господарстві для підвищення урожаю при обробці насіння.

Нітрагін використовують для обробки насіння бобових культур:

- з бактерій, що характеризуються повільним ростом, для обробки насіння люпину, сераделі, еспарцету і сої;
- з бактерій, що характеризуються швидким ростом, для обробки насіння гороху, вики, квасолі, кормових бобів, конюшини, люцерни, буркуну та нуту.

По органолептичним, фізичним і біологічним показникам нітрагін сухий має відповідати вимогам, вказаним у таблиці 4.1.

Таблиця 4.1. Нормативні характеристики препарату нітрагіну

Найменування показника	Характеристика і норма нітрагіну з бактерій, що характеризуються швидким ростом
1	2
Зовнішній вигляд, колір і запах	Однорідний порошок від світло-сірого до коричневого
Масова доля вологи, %	2,0-10,0
Масова доля залишку після просіювання на ситі з сіткою N 25, %, не більше	5,0

Продовження таблиці 4.1

1	2
Число життєздатних клітин бульбочкових бактерій в 1 г нітрагіну, млрд, не менше до кінця строку зберігання	5,0
Число клітин сторонніх мікроорганізмів, %, від числа клітин бульбочкових бактерій, не більше	3,0

Форма продукції – однорідний сухий порошок, тара для пакування і транспортування – пакети поліетиленові по 200, 400, 1000 г.

Маркування наносять на кожну одиницю споживчої упаковки або на ярлик із зазначенням:

- найменування підприємства-виробника та / або його товарного знаку;
- найменування препарату;
- номер партії;
- маси нетто;
- дати виготовлення;
- гарантійного терміну зберігання.

Маркують нітрагін із зазначенням маніпуляційних знаків "Боїться вологості", "Боїться нагріву", "Гаками безпосередньо не брати".

Продукцію перевозять залізничним і автомобільним транспортом з дотриманням правил, що діють на транспорті даного виду в критих транспортних засобах. По залізницях упаковану продукцію транспортують вагонними відправками в критих вагонах або в універсальних контейнерах. Не допускається спільне транспортування продукції з продуктами харчування. Не допускається використовувати для транспортування транспортні засоби, які використовувалися для перевезення отрутохімікатів. Транспортні засоби повинні бути сухими і чистими.

Гарантійний термін зберігання нітрагіну - 9 місяців з дня виготовлення. Зберігають препарат при температурі природних умов, але не вище 15°C і не нижче мінус 30°C.

4.2. Характеристика сировини та матеріалів

Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у даному виробництві, наведена у таблиці 4.2.

Таблиця 4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряють показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1.Основна сировина			
1.1. Бентоніт порошок	ГОСТ 28177-89. Глины формовочные бентонитовые. Общие технические условия	Масова частка монтмориллоніту, %, не менше Концентрація об'ємних катіонів, мг·екв/100 г сухого порошку, не менше Масова частка карбонатів в перерахунку на CaCO ₃ , %, не більше Масова частка сульфідної сірки, %, не більше Масова частка заліза в перерахунку на Fe ₂ O ₃ , %, не більше Колоїдальність, %, не більше Водопоглинання, одиниці, не більше	30 30 10 0,3 12,0 10,0 1,5
1.2. Глюкоза кристалічна	ГОСТ 975-88 Глюкоза кристаллическая гидратная. Технические условия	Зовнішній вигляд	Білий кристалічний порошок

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4
		Смак	Солодкий, без стороннього присмаку
		Запах	Властивий глюкозі, без стороннього запаху
		Колірність розчину в одиницях оптичної густини, не більше	0,1
		Прозорість розчину, світлопропускання, %, не більше	80
		Масова доля вологи, %, не більше	9
		Питоме обертання, град.	52,5-53
		Масова доля золи в перерахунку на суху речовину, %, не більше	0,07
		Масова доля заліза в перерахунку на суху речовину, %, не більше	0,003
		Присутність вільних мінеральних кислот	Не допускається
1.3. Дріжджовий екстракт сухий	ТУ 9385-007- 39484474-2003 Дрожжевой экстракт сухой	Кількість мезофільних аеробних і факультативно анаеробних мікроорганізмів в 1 г, КУО, не більше	$1 \cdot 10^3$

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4
		Дріжджі в 1 г, КУО, не більше	10
		БГКП (коліформи) в масі продукту	Не допускаються
1.4. Екстракт кукурудзяний згущений	ОСТ 18-005-94 Экстракт кукурузный сгущенный	Вміст сухих речовин, %	48
		Вміст золи, %	21
		Вміст азоту, %	6,4
1.5. Калій фосфорнокислий двузаміщений 3-водний	ГОСТ 2493-75. Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия	Масова частка калію фосфорнокислого двузаміщеного 3-водного, не менше	99
		Масова частка нерозчинних в воді речовин, %, не більше	0,005
		Масова частка азоту, %, не більше	0,001
		Масова частка сульфатів, %, не більше	0,005
		Масова частка хлоридів, %, не більше	0,001
		Масова частка заліза, %, не більше	0,0005
		Масова частка арсену, %, не більше	0,00005
		Масова частка важких металів, %, не більше	0,0005
		Масова частка натрію, % не більше	0,1

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4
		<i>pH</i> розчину препарату з масовою часткою 5%	8,9-9,3
1.6. Магній сірчано-кислий 7-водний	ГОСТ 4523-77. Магний серно-кислий 7-водный. Технические условия	Масова частка 7-водного сірчано-кислого магнію, %, не менше	99,5
		Масова частка нерозчинних в воді речовин, %, не більше	0,002
		Кислотність, %, не більше	0,002
		Лужність, %, не більше	0,002
		Масова частка нітратів, %, не більше	0,001
		Масова частка фосфатів, %, не більше	0,0005
		Масова частка хлоридів, %, не більше	0,0005
		Масова частка амонійних солей, %, не більше	0,001
		Масова частка заліза, %, не більше	0,0002
		Масова частка кальцію, %, не більше	0,01
		Масова частка марганцю, %, не більше	0,0005
1.7. Натрій хлористий	ГОСТ 4233-77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия	Масова частка хлористого натрію в прокаленому препараті, %, не менше	99,9

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4
		Масова частка нерозчинних в воді речовин, %, не більше	0,003
		Масова частка втрат при прокалюванні, %, не більше	0,5
		Масова частка загального азоту, %, не більше	0,0005
		Масова частка йодидів, %, не більше	0,001
		Масова частка бромідів, %, не більше	0,005
		Масова частка сульфатів, %, не більше	0,001
		Масова частка фосфатів, %, не більше	0,0005
		Масова частка магнію, %, не більше	0,001
		Масова частка арсену, %, не більше	0,0005
		Масова частка важких металів, %, не більше	0,00002
		Масова частка кальцію, %, не більше	0,0002
		pH розчину препарату з масовою часткою 5%	5-8

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4
1.8. Сульфат амонію	ГОСТ 9097-82 Сульфат аммония. Технические условия	Зовнішній вигляд Масова частка азоту, %, не менше Масова частка води, %, не більше Масова частка вільної сірчаної кислоти, %, не більше Розсипчастість Масова частка нерозчинного у воді залишку, %, не більше Масова частка фракцій розміром більше 0,5 мм, %, не менше	Білі або прозорі кристали 21 0,2 0,03 100 0,02 80
2. Допоміжна сировина			
2. 1. Вода питна	ДСТУ 7525: 2014 Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості	Число бактерій в 1 см ³ води, що досліджують (ЗМЧ) за 37°C, КУО/см ³ Число бактерій в 1 см ³ води, що досліджують (ЗМЧ) за 22°C, КУО/см ³ Число бактерій групи кишкових паличок (коліформних мікроорганізмів) в 1 дм ³ води, КУО/дм ³ Число патогенних мікроорганізмів в 1дм ³ води, КУО/дм ³	20 20 Відсутність Відсутність

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4
		Число термостабільних кишкових паличок (фекальних колиформ) у 100 см ³ води, КУО/100 см ³	Відсутність
		Число колифагів в 1 дм ³ води, що досліджують, БУО/дм ³	Відсутність
		Спори сульфіторедукувальних клостридій, наявність/20 см ³	Відсутність
		Синьогнійна паличка, КУО/дм ³	Відсутність
2.2. Кальцію гіпохлорит	ГОСТ 25263-82. Кальция гипохлорит нейтральный. Технические условия	Зовнішній вигляд	Порошкоподібний продукт білого кольору або слабозабарвлений
		Масова частка активного хлору	60
		Масова частка води, %, не більше	2
		Масова частка нерозчинного залишку, %, не більше	12
		Коефіцієнт термостабільності, не менше	0,90
2.3. Кислота соляна	ГОСТ 3118-77. Реактивы. Кислота соляная. Технические условия	Масова частка соляної кислоти, %	35-38
		Масова частка залишку після прокалювання, %, не більше	0,0005

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4
		Масова частка сульфідів (SO_3), %, не більше	0,0002
		Масова частка сульфатів (SO_4), %, не більше	0,0002
		Масова частка вільного хлору, %, не більше	0,00005
		Масова частка амонійних солей, %, не більше	0,0003
		Масова частка заліза, %, не більше	0,00005
		Масова частка арсену, %, не більше	0,000005
		Масова частка важких металів, %, не більше	0,00005
2.4. Меляса бурякова	ДСТУ 3696-98 Меляса бурякова. Технічні умови	Зовнішній вигляд	Густа в'язка непрозора рідина
		Колір	Від коричневого до темно-бурого
		Запах	Властивий буряковоцукровій мелясі без стороннього запаху
		Смак	Солодкий з гіркуватим присмаком
		Розчинність у воді	Повна, розчиняється у гарячій і холодній воді

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4
		Масова частка сахарози,%, не менше	43,0
		Масова частка суми цукрів, що зброджуються, %, не менше	44,0
		Величина рН	6,5 - 8,5
		Загальна кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів, КУО в 1 г, не більше	1,0x10 ⁵
		Плісняві гриби, КУО в 1 г, не більше	1,5x10 ⁴
		Вміст токсичних елементів, мг/кг: ртуть	0,02
		миш'як	1,0
		мідь	25,0
		свинець	1,0
		кадмій	0,05
		цинк	50,0
		Вміст пестицидів, мг/кг, не більше : гексахлоран ГХЦГ гама-ізомер	0,005
		фостоксин	0,01
		ДДТ	0,005

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4
2.5. Натрію гідроксид	ГОСТ 4328-77. Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия	Масова частка гідроксиду натрію, %, не менше	99
		Масова частка вуглекислого натрію, %, не більше	0,8
		Масова частка загального азоту, %, не більше	0,0003
		Масова частка силікатної кислоти, %, не більше	0,002
		Масова частка сульфатів, %, не більше	0,0005
		Масова частка фосфатів, %, не більше	0,0005
		Масова частка хлоридів, %, не більше	0,0025
		Масова частка алюмінію, %, не більше	0,0005
		Масова частка заліза, %, не більше	0,0005
		Масова частка кальцію і магнію в перерахунку на магній, %, не більше	0,005
		Масова частка калію, %, не більше	0,01
		Масова частка важких металів	0,0005

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4
		Масова частка арсену, %, не більше	0,00004
2.6. Тіосечовина	ГОСТ 6344-73 Реактивы. Тиомочевина. Технические условия	Масова частка тіосечовини, %, не менше	99,0
		Масова частка нерозчинних у воді речовин, %, не більше	0,002
		Масова частка залишку після прокалювання у вигляді сульфатів, %, не більше	0,004
		Масова частка роданідів, %, не більше	0,005
		Масова частка важких металів, %, не більше	0,0005
3. Матеріали			
3.1. Пакети поліетиленові	ДСТУ 7275:2012. Пакеты из полимерных и комбинированных материалов. Общие технические условия	Зовнішній вигляд Товщина плівки Розміри Герметичність швів Якість нанесення печатки	

4.3. Опис технологічного процесу

Вибір технологічних способів та прийомів реалізується на основі відомої типової технології, описаної в роботі [35].

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Підготовка персоналу включає періодичне медичне обстеження, навчання персоналу та підготовка персоналу до роботи.

ДР 1.2. Підготовка миючих, дезінфікуючих та робочих розчинів

ДР 1.2.1. Підготовка дезінфікуючих розчинів

У реактор-змішувач подається по магістральному трубопроводу вода питна та порошок гіпохлориту кальцію. Готується розчин хлорного вапна концентрацією 2 %.

ДР 1.2.2. Підготовка миючих розчинів

У реактор-змішувач подається NaOH зі складу та вода питна по магістральному трубопроводу. Готується розчин лугу з концентрацією 1%.

ДР 1.2.3. Підготовка робочих розчинів

ДР 1.2.3.1. Підготовка розчину бентоніту

До реактора змішувача подається бентоніт зі складу та вода питна по магістральному трубопроводу. Готується розчин бентоніту з концентрацією 3%.

ДР 1.2.3.2. Підготовка захисного розчину

До реактора змішувача подається, меляса зі складу шестерними насосами, тіосечовина зі складу та вода питна по магістральному трубопроводу. Готується захисний розчин з концентрацією меляси 20% та концентрацію тіосечовини 1%.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

Здійснюють вологе прибирання виробничих приміщень. Підлоги, стіни, а також поверхню апаратів, збірників, трубопроводів обробляють розчином хлорного вапна 2% від ДР 1.2.1.

ДР 2. Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 2.1. Мийка обладнання та комунікацій

Обладнання та комунікації миють водою питною, яка подається по магістральному трубопроводу. Миття продовжують розчином NaOH 1% від ДР 1.2.2. Проводиться ополіскування водою питною. Відпрацьовані розчини відправляються до ЗВ 12 на нейтралізацію.

ДР 2.2. Перевірка на герметичність

Перевірка обладнання на герметичність здійснюється при тиску 0,2 МПа протягом 30 хв. На манометрі не має змінюватися показник тиску. Для

визначення мікропропусків додатково обмилюються фланцеві з'єднання та трубопроводи. Не мають утворюватися бульбашки.

ДР 2.3. Стерилізація обладнання та комунікацій.

Стерилізація здійснюється при тиску 0,2 МПа, температурі 110°C протягом 90 хв гострою парою, яка подається в середину апарату та в прилеглі комунікації.

ДР 3. Підготовка стерильного повітря

ДР 3.1. Забір повітря з атмосфери

Забір повітря проводиться за допомогою трубчатих конструкцій на висоті 8-10 м.

ДР 3.2. Попередня очистка повітря

Здійснюється на фільтрах попередньої очистки, що дозволяють видалити частки більше 5 мкм. Ефективність очистки – 50-60%

ДР 3.3. Транспортування повітря

Компресор здійснює стискання попередньо очищеного повітря до тиску 0,2 МПа, щоб забезпечити належний об'єм подачі і відповідний до технологічних вимог тиск повітря. Внаслідок адіабатного стискання повітря розігрівається до 100-120°C.

ДР 3.4. Охолодження повітря

Повітря з компресора проходить через теплообмінник та охолоджується до температури 28-30°C холодною водою.

ДР 3.5. Осушення повітря

На даному етапі необхідно згладити пульсації у тиску при роботі компресійного обладнання та видалити крапельну вологу. Охолоджене повітря потрапляє у ресивер, де уловлюється волога, що утворилася під час охолодження, при багатократній зміні напрямку руху повітря під час контакту з насадкою ресивера. Конденсат направляється до ЗВ 12. Вологість повітря на виході – 60%.

ДР 3.6. Очистка повітря на головному фільтрі

Здійснюється на глибинних набивних фільтрах. Ефективність очистки – 90-99%.

ДР 3.7. Очистка повітря на індивідуальному фільтрі

Здійснюється на фільтрі тонкої очистки, що встановлюється безпосередньо перед входом аераційного повітря у ферментер. В якості індивідуального фільтру використовується патронний фільтруючий елемент. Ефективність очистки повітря – 99,9999999%

ДР 4. Підготовка та стерилізація поживного середовища

ДР 4.1. Приготування поживного середовища

В якості поживного середовища в стандартній технології використовується середовище на основі бобового відвару. Таке середовище дозволяє отримати потрібний титр бактерій в препараті, проте препарати, отримані на бобовому відварі, через 2-3 міс після початку зберігання втрачають свою якість через розвиток в них сторонньої мікрофлори [36]. Тому в даній технології використовується напівсинтетичне середовище. Напівсинтетичні середовища готують з хімічно чистих мінеральних солей і концентрованих органічних компонентів, таких як дріжджовий екстракт, в точно відміряних концентраціях [37].

До реактора-змішувача вноситься вода питна та дозуються компоненти поживного середовища зі складу. Готується середовище складу ($\frac{г}{л}$): кукурудзяний екстракт – 6,0; глюкоза – 10,0; NaCl – 0,2; K_2HPO_4 – 0,5; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; дріжджовий екстракт – 3,0; вода питна. Гомогенізація середовища відбувається при числі обертів мішалки 90 об/хв та при нагріванні 50°C. рН середовища має становити 3,0 для попередження утворення аміноцукрів при сумісній стерилізації азотовмісних компонентів та глюкози. Регуляція рН відбувається внесенням розчину 1 н HCl.

ДР 4.2. Стерилізація поживного середовища

Стерилізація здійснюється термохімічним способом. Стерилізація при кислих значеннях рН не супроводжується руйнуванням органічних компонентів і не приводить, при подальшій нейтралізації, до зниження

швидкості росту культури продуцента. При рН 3,0 повна стерилізація поживного середовища досягається при 90°C протягом 40 хв.

ДР 4.3. Нейтралізація середовища

Охолоджене середовище нейтралізують стерильним розчином NaOH зі складу до рН 6,8-7,0 [38].

ДР 5. Відновлення музейної культури

Чисту культуру пересівають і реактивують на качалках-шейкерах при постійній температурі 28°C з метою відновлення фізіологічної активності.

Відновлення здійснюють протягом 24-48 годин при рН 6,5-7,5 [40].

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

Для отримання посівного матеріалу розмножену культуру *Rhizobium meliloti* Л5-1/24 з лабораторії культивують в інокуляторі об'ємом 10 л на середовищі складу ($\frac{г}{л}$): кукурудзяний екстракт – 6,0; глюкоза – 10,0; NaCl – 0,2; K₂HPO₄ – 0,5; (NH₄)₂SO₄ – 0,5; MgSO₄·7H₂O – 0,2; дріжджовий екстракт – 3,0; вода питна.

Режим культивування: рН=6,5-7,5; аерація повітрям від ДР 3.5; перемішування $n=200$ об/хв; $\tau=24-48$ год, $t=25-28^\circ\text{C}$. Культивування здійснюють до титру клітин 2 млрд/мл.

ТП 7. Виробниче культивування

Посівна культура від ТП 6 надходить у ферментер з механічним перемішуючим пристроєм об'ємом 130 л. Культивування здійснюється на рідкому поживному середовищі складу ($\frac{г}{л}$): кукурудзяний екстракт – 6,0; глюкоза – 10,0; NaCl – 0,2; K₂HPO₄ – 0,5; (NH₄)₂SO₄ – 0,5; MgSO₄·7H₂O – 0,2; дріжджовий екстракт – 3,0; вода питна.

Режим культивування: рН=6,5-7,5; рівень аерації 0,8-1,2 м³/м³·хв; перемішування $n=300-400$ об/хв; $\tau=22-25$ год, $t=25-28^\circ\text{C}$. Культивування здійснюється до титру клітин 10 млрд/мл.

ТП 8. Відділення маси мікроорганізмів від культуральної рідини

ТП 8.1. Осадження біомаси шляхом відстоювання

Для попереднього відділення біомаси та адсорбції бактерій на бентоніті культуральну рідину після виробничого біосинтезу подають у збірник, що допомагає забезпечити більшу виживаність бактерій в умовах сушки [39]. До культуральної рідини додається розчин бентоніту 3 % у пропорції 1:1. Суміш відстоюють протягом 3 год. Надосадову рідину направляють до ЗВ 12.

ТП 8.2. Центрифугування осаду

Осад від стадії ТП 8.1 центрифугують при 3000 об/хв протягом 30 хв. При цьому отримують біомасу бактерій, адсорбованих на бентоніті, вологістю 70-80%. Фугат направляють до ЗВ 12.

ТП 9. Висушування біомаси бактерій

ТП 9.1. Додавання захисного розчину

Отриману біомасу бактерій у збірнику змішують з захисним розчином від ДР 1.2.3.2, що містить 20% меляси і 1% тіосечовини, у співвідношенні 1:5.

ТП 9.2. Вакуум-висушування біомаси бактерій

Висушування здійснюється під вакуумом 10-13 кПа при 30-35°C до 2-5% залишкової вологості.

ТП 10. Стандартизація висушеної біомаси.

Висушену біомасу стандартизують бентонітом до вмісту бактеріальних клітин 5 млрд КОЕ/г.

ПМВ 11. Фасування та пакування продукту

Фасування здійснюється на фасувальних апаратах. Готовий продукт сухий нітрагін фасується в поліетиленові пакети зі складу по 200/400/1000 г на пакет.

4.4. Матеріальний баланс

Матеріальний баланс виробництва наведений у таблиці 4.3.

Таблиця 4.3. Матеріальний баланс на один цикл виробництва нітрагіну

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
	кг	л	шт		кг	л	шт
1	2	3	4	5	6	7	8
Стадія ДР 1.2.1							
Кальцію гіпохлорит	1			Хлорне вапно 2%		50	
Вода питна		49					
Всього	50			Всього	50		
Стадія ДР 1.2.2							
Натрію гідроксид	0,5			Розчин натрію гідроксиду 1%		50	
Вода питна		49,5					
Всього	50			Всього	50		
Стадія ДР 1.2.3.1							
Бентоніт порошок	1,35			Розчин бентоніту 3%		45	
Вода питна		43,65					
Всього	45			Всього	45		
Стадія ДР 1.2.3.2							
Меляса бурякова	2,76 4			Захисний розчин		13,82	
Тіосечовина	0,13 82						
Вода питна		10,91 78					
Всього	13,82			Всього	13,82		
Стадія ДР 1.3							
Хлорне вапно 2%		50		Відпрацьовані розчини		100	
Вода питна		50					
Всього	100			Всього	100		
Стадія ДР 2.1							
Розчин натрію гідроксиду 1%		50		Відпрацьовані розчини		150	
Вода питна		100					
Всього	150			Всього	150		
Стадія ДР 4.1							
Глюкоза кристалічна		0,501 2		Поживне середовище		50,10 5	
Дріжджовий екстракт сухий		0,150 3					
Екстракт кукурудзяний згущений		0,300 6					

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5	6	7	8
Калій фосфорнокислий двузаміщений 3- водний		0, 0251					
Магній сірчано- кислий 7-водний		0,01		Втрати (2%)		1	
Натрій хлористий		0,01					
Сульфат амонію		0,025 1					
Вода питна		50,08 27					
Всього	51,105			Всього	51,105		
Стадія ДР 5							
Поживне середовище		0,555		Розмножена культура продуценту		0,55	
Відновлена музейна культура		0,005		Використані колби			5
Колби			5	Втрати (2 %)		0,01	
Всього	5,56			Всього	5,56		
Стадія ТП 6							
Розмножена культура продуценту		0,55		Посівний матеріал		5	
Поживне середовище		4,55		Втрати (2%)		0,1	
Всього	5,1			Всього	5,1		
Стадія ТП 7							
Поживне середовище		45		Культуральна рідина		45	
Посівний матеріал		5		Втрати (10%)		5	
Всього	50			Всього	50		
Стадія ТП 8.1							
Культуральна рідина		45		Надосадова рідина		13,5	
				Осад		74,97	
Розчин бентоніту 3%		45		Втрати (2%)		1,53	
Всього	90			Всього	90		

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5	6	7	8
Стадія ТП 8.2							
Осад		74,97		Надосадова рідина		3,75	
				Біомаса бактерій		69,08	
				Втрати (3%)		2,14	
Всього	74,97			Всього	74,97		
Стадія ТП 9.1							
Біомаса бактерій		69,08		Суміш біомаси бактерій та захисного розчину		81,2	
Захисний розчин		13,82		Втрати (2%)		1,7	
Всього	82,9			Всього	82,9		
Стадія ТП 9.2							
Суміш біомаси бактерій та захисного розчину		81,2		Нітрагін сухий	19,9		
				Конденсат		60,9	
				Втрати (2%)	0,4		
Всього	81,2			Всього	81,2		
Стадія ПМВ 11							
Пакети поліетиленові, місткість 1000 г			16	Пакети поліетиленові з 1000 г нітрагіну сухого			16
Пакети поліетиленові, місткість 400 г			8	Пакети поліетиленові з 400 г нітрагіну сухого			8
Пакети поліетиленові, місткість 200 г			3	Пакети поліетиленові з 200 г нітрагіну сухого			3
				Розфасований нітрагін	19,8		
Нітрагін сухий	19,9			Залишок нітрагіну сухого	0,1		
Всього	46,9			Всього	46,9		

4.5. Контроль виробництва

Перелік контрольних точок, що забезпечують виконання технологічного режиму, наведений у таблиці 4.4.

Таблиця 4.4. Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1.2.1. Підготовка дезінфікуючих розчинів Кх 1.2.1.1	Хлорне вапно, Кількість $\text{Ca}(\text{ClO})_2$	Ваги, мірний посуд, візуально.	Кожну операцію	2%
ДР 1.2.2. Підготовка миючих розчинів Кх 1.2.2.1	Розчин NaOH , Кількість NaOH	Ваги, мірний посуд, візуально.	Кожну операцію	1%
ДР 1.2.3.1. Підготовка розчину бентоніту Кх 1.2.3.1.1	Розчин бентоніту, Кількість бентоніту	Ваги, мірний посуд, візуально.	Кожну операцію	3%
ДР 1.2.3.2 Підготовка захисного розчину Кх 1.2.3.2.1	Розчин захисний, Кількість меляси	Ваги, мірний посуд, візуально.	Кожну операцію	20%
ДР 1.2.3.2 Підготовка захисного розчину Кх 1.2.3.2.2	Розчин захисний, Кількість тіосечовини	Ваги, мірний посуд, візуально.	Кожну операцію	1%
ДР 2.2 Перевірка на герметичність Кт 2.2.1	Режим перевірки обладнання на герметичність, Тиск	Манометр, візуально.	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР 2.2 Перевірка на герметичність Кт 2.2.2	Режим перевірки обладнання на герметичність, Час	Годинник, візуально.	Кожну операцію	30 хв
ДР 2.3. Стерилізація обладнання та комунікацій Кт 2.3.1	Режим стерилізації обладнання та комунікацій, Тиск	Манометр, візуально.	Кожну операцію	0,2 МПа

Продовження таблиці 4.4

1	2	3	4	5
ДР 2.3. Стерилізація обладнання та комунікацій Кт 2.3.2	Режим стерилізації обладнання та комунікацій, Температура	Термометр, візуально.	Кожну операцію	110°C
ДР 2.3. Стерилізація обладнання та комунікацій Кт 2.3.3	Режим стерилізації обладнання та комунікацій, Час	Годинник, візуально.	Кожну операцію	90 хв
ДР 3.1. Забір повітря з атмосфери Кт 3.1.1	Труба забору повітря, Висота, на якій здійснюється забір повітря	Геодезичний контроль геометричних параметрів	Одноразово	8-10 м
ДР 3.2. Попередня очистка повітря Км 3.2.1	Повітря аераційне, Ефективність очистки	Аспіраційний метод	При заміні фільтру	50-60%
ДР 3.2. Попередня очистка повітря Кт 3.2.2	Повітря аераційне, Різниця тисків	Манометр, візуально	Кожну операцію	200-700 Па
ДР 3.3. Транспортування повітря Кт 3.3.1	Режим транспортування повітря, Тиск	Манометр, візуально.	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР 3.4. Охолодження повітря Кт 3.4.1	Повітря аераційне, Температура	Термометр, візуально	Кожну операцію	28-30°C
ДР 3.5. Охолодження повітря Кт 3.4.2	Повітря аераційне, Тиск	Манометр, візуально	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР 3.6. Очистка повітря на головному фільтрі Км 3.6.1	Повітря аераційне, Ефективність очистки	Аспіраційний метод	При заміні фільтру	90-99%

Продовження таблиці 4.4

1	2	3	4	5
ДР 3.6. Очистка повітря на головному фільтрі Кт 3.6.2	Повітря аераційне, Температура	Термометр, візуально	Кожну операцію	
ДР 3.7. Очистка повітря на індивідуальному фільтрі Км 3.7.1	Повітря аераційне, Ефективність очистки	Аспіраційний метод	При заміні фільтру	99,9999999%
ДР 4.1. Приготування поживного середовища Кт 4.1.1	Режим приготування поживного середовища, Інтенсивність перемішування	Тахометр, візуально	Кожну операцію	90 об/хв
ДР 4.1. Приготування поживного середовища Кх 4.1.2	Поживне середовище, рН	Датчик рН, візуально.	Кожну операцію	3,0
ДР 4.1. Приготування поживного середовища Кх 4.1.3	Поживне середовище, Концентрація кукурудзяного екстракту	Ваги, мірний посуд, візуально.	Кожну операцію	6,0 г/л
ДР 4.1. Приготування поживного середовища Кх 4.1.4	Поживне середовище, Концентрація глюкози	Ваги, мірний посуд, візуально.	Кожну операцію	10,0 г/л
ДР 4.1. Приготування поживного середовища Кх 4.1.5	Поживне середовище, Концентрація дріжджового екстракту	Ваги, мірний посуд, візуально.	Кожну операцію	3,0 г/л
ДР 4.1. Приготування поживного середовища Кх 4.1.6	Поживне середовище, Концентрація NaCl	Ваги, мірний посуд, візуально.	Кожну операцію	0,2 г/л

Продовження таблиці 4.4

1	2	3	4	5
ДР 4.1. Приготування поживного середовища Кх 4.1.7	Поживне середовище, Концентрація K_2HPO_4	Ваги, мірний посуд, візуально.	Кожну операцію	0,5 г/л
ДР 4.1. Приготування поживного середовища Кх 4.1.8	Поживне середовище, Концентрація $(NH_4)_2SO_4$	Ваги, мірний посуд, візуально.	Кожну операцію	0,5 г/л
ДР 4.1. Приготування поживного середовища Кх 4.1.9	Поживне середовище, Концентрація $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Ваги, мірний посуд, візуально.	Кожну операцію	0,2 г/л
ДР 4.2. Стерилізація поживного середовища Кт 4.2.1	Режим стерилізації поживного середовища, Тиск	Манометр, візуально	Кожну операцію	0,07 МПа
ДР 4.2. Стерилізація поживного середовища Кт 4.2.2	Режим стерилізації поживного середовища, Температура	Термометр, візуально.	Кожну операцію	90°C
ДР 4.2. Стерилізація поживного середовища Кт 4.2.3	Режим стерилізації поживного середовища, Час	Годинник, візуально.	Кожну операцію	40 хв
ДР 4.3. Нейтралізація середовища Кх 4.3.1	Поживне середовище, рН	Датчик рН, візуально.	Кожну операцію	6,8-7,0
ДР 5. Відновлення музейної культури Кт 5.1	Режим культивування, Температура	Термометр, візуально.	Кожну операцію	28°C

Продовження таблиці 4.4

1	2	3	4	5
ДР 5. Відновлення музейної культури Кт 5.2	Режим культивування, Час	Годинник, візуально.	Кожну операцію	24 год
ДР 5. Відновлення музейної культури Кх 5.1	Режим культивування, рН середовища	Датчик рН, візуально.	Кожну операцію	6,5-7,5
ТП 6. Підготовка посівного матеріалу Кх 6.1	Режим культивування, рН середовища	Датчик рН, візуально.	Кожну операцію	6,5-7,5
ТП 6. Підготовка посівного матеріалу Кт 6.1	Режим культивування, Число обертів мішалки	Тахометр, візуально	Кожну операцію	200 об/хв
ТП 6. Підготовка посівного матеріалу Кт 6.2	Режим культивування, Температура	Термометр, візуально.	Кожну операцію	25-28°C
ТП 6. Підготовка посівного матеріалу Кт 6.3	Режим культивування, Час	Годинник, візуально.	Кожну операцію	24-48 год
ТП 6. Підготовка посівного матеріалу Км 6.1	Посівний матеріал, Титр клітин	Приготування ряду послідовних розведень з висівом на чашки Петрі і підрахунком бактеріальних колоній	Кожну операцію	2 млрд/мл
ТП 7. Виробниче культивування Кх 7.1	Режим культивування, рН	Датчик рН, візуально.	Кожну операцію	6,5-7,5
ТП 7. Виробниче культивування Кт 7.1	Режим культивування, Температура	Термометр, візуально.	Кожну операцію	25-28°C

Продовження таблиці 4.4

1	2	3	4	5
ТП 7. Виробниче культивування Кт 7.2	Режим культивування, Витрати повітря	Витратомір	Кожну операцію	
ТП 7. Виробниче культивування Кт 7.3	Режим культивування, Час	Годинник, візуально.	Кожну операцію	22-25 год
ТП 7. Виробниче культивування Кт 7.4	Режим культивування, Число обертів мішалки	Тахометр, візуально	Кожну операцію	300-400 об/хв
ТП 7. Виробниче культивування Км 7.1	Культуральна рідина, Титр клітин	Приготування ряду послідовних розведень з висівом на чашки Петрі і підрахунком бактеріальних колоній	Кожну операцію	10 млрд/мл
ТП 8.1. Осадження біомаси шляхом відстоювання Кт 8.1.1	Режим осадження, Час	Годинник, візуально	Кожну операцію	3 год
ТП 8.1. Осадження біомаси шляхом відстоювання Кх 8.1.2	Суміш культуральної рідини та розчину бентоніту, співвідношення концентрацій культуральної рідини та розчину бентоніту 3%	Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію	1:1
ТП 8.2. Центрифугування осаду Кт 8.2.1	Режим центрифугування, Час	Годинник, візуально	Кожну операцію	30 хв
ТП 8.2. Центрифугування осаду Кт 8.2.2	Режим центрифугування, Частота обертання	Тахометр, візуально	Кожну операцію	3000 об/хв

Продовження таблиці 4.4

1	2	3	4	6
ТП 9.1. Додавання захисного розчину	Суміш біомаси бактерії та захисного розчину, Співвідношення концентрацій біомаси бактерій та захисного розчину	Ваги, мірний посуд, візуально		
ТП 9.2. Вакуум- висушування біомаси бактерій Кт 9.2.1	Режим висушування, Тиск	Вакуумметр, візуально	Кожну операцію	10-13 кПа
ТП 9.2. Вакуум- висушування біомаси бактерій Кт 9.2.2	Режим висушування, Температура	Термометр, візуально	Кожну операцію	30-35°C
ТП 10. Стандартизація висушеної біомаси Кт 10.1	Висушена біомаса, Титр клітин	Приготування ряду послідовних розведень з висівом на чашки Петрі і підрахунком бактеріальних колоній	Кожну операцію	5 КОЕ/г
ПМВ 11. Фасування та пакування продукту Кт 11.1	Готовий продукт, Маса фасованого продукту	Ваги, візуально	Кожну операцію	200/400/1000 г/пакет

Таким чином, запропонована технологія виробництва сухого нітрагіну з використанням модифікованого поживного середовища, що дозволяє не тільки отримати необхідний титр бактерій, але й забезпечити його тривале зберігання без розвитку сторонньої мікрофлори. Також у порівнянні з попередніми технологіями, що передбачали змішування висушеної культури бактерій з носієм після сушки, розроблена технологія передбачає попередню

адсорбцію на носії бентоніті перед сушкою для підвищення життєздатності бактерій в умовах висушування.

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Існує два основних типи культивування, періодичне культивування і безперервне культивування. При періодичному культивуванні всі необхідні поживні компоненти вносять до початку процесу, при цьому в ході ферментації додаткове харчування не вводиться, метаболіти не відводяться і фізичні параметри процесу не змінюються. Коли утворюється достатня кількість цільового продукту – процес зупиняють, продукт очищають і звільняють ферментер для продовження циклу культивування. При промисловому виробництві препаратів бульбочкових бактерій використовують періодичне культивування, що пов'язано з простотою апаратурного оформлення [40].

Штами бульбочкових бактерій отримують методом глибинного культивування в ферментерах місткістю від 0,1 до 3 м³. [41].

Оскільки вибір конструкції здійснюється серед ферментерів місткістю від 0,1 до 3 м³, енергетичні затрати на процеси ферментації не є визначаючим фактором. Особливості сировини, що використовується, в також властивості культури мікроорганізмів є вирішальними факторами у виборі способу перемішування і аерації середовища.

Найбільш поширеними конструкціями апаратів такого об'єму є ерліфтні апарати, барботажні колони та апарати з механічним перемішуванням (рисунок 5.1).

В барботажних колонах повітря подається під високим тиском в нижню частину біореактора; по мірі підйому маленькі пухирці повітря об'єднуються, що приводить до нерівномірного розподілення повітря. Крім того подача повітря під високим тиском може призвести до значного піноутворення. Все це обмежує універсальність даних конструкцій і звужує діапазон технологічних умов.

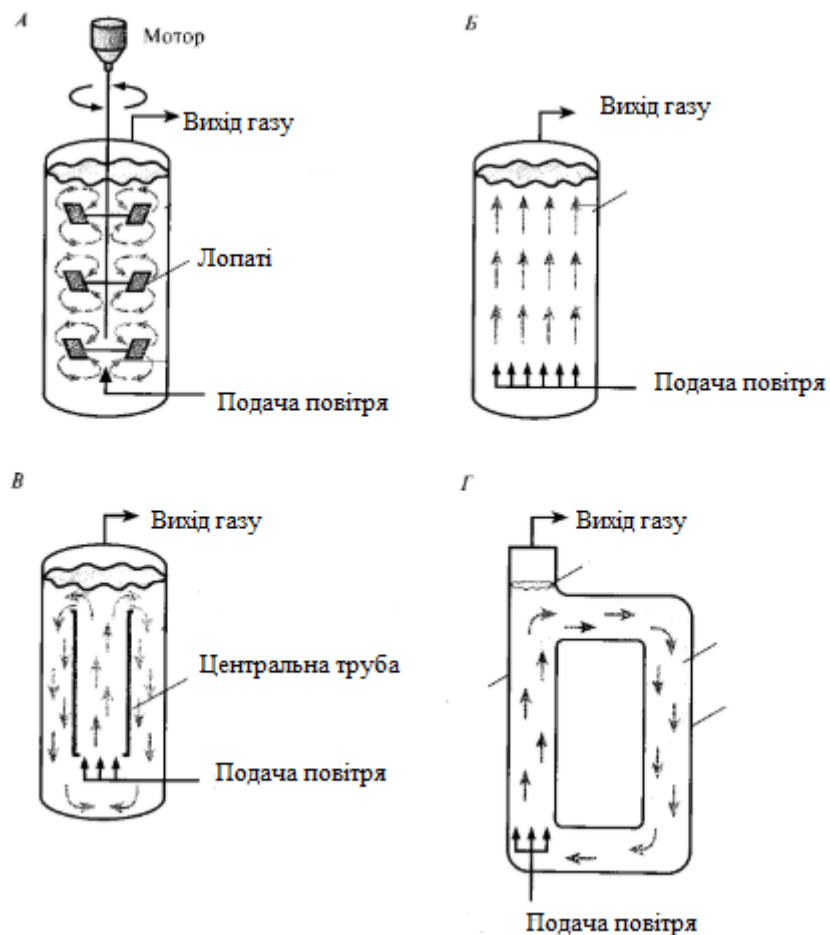


Рисунок 5.1. Типи ферментерів (спрощена схема). А. Реактор з механічним перемішуванням. Б. Барботажна колона. В. Ерліфтний реактор з внутрішньою рециркуляцією. Г. Ерліфтний реактор з зовнішньою системою рециркуляції. Стрілки – напрям потоку культуральної рідини.

В ерліфтних установках газ подається в нижню частину вертикального каналу. Піднімаючись, він захоплює за собою рідину в верхню частину каналу, і тут частково виходить. Більш щільна неаерована рідина опускається по іншому вертикальному каналу до дна реактора, і процес повторюється. Таким чином, культуральна рідина разом з клітинами безперервно циркулює в реакторі. Ерліфтні біореактори бувають двох основних типів. В першому випадку ферментер – це ємність з центральною трубкою, яка забезпечує циркуляцію рідини (реактори з внутрішньою циркуляцією) (рисунок 5.1, В). В другому випадку культуральна рідина проходить через окремі, незалежні

канали (реактор з зовнішньою циркуляцією) (рисунок 5.1, Г). Конструкція ерліфтних простіша, але в них обмежена регуляція швидкості циркуляції. В біореакторах з зовнішньою циркуляцією можна модифікувати умови ферментації.

Конструкційні особливості барботажних і ерліфтних біореакторів надають їм деякі переваги перед реакторами з механічним перемішуванням. Вони більш економічні, оскільки перемішування в них відбувається за рахунок потоку повітря, а не механічної мішалки, що потребує багато енергії. Крім того, при відсутності механічної мішалки виключається одна із можливостей проникнення сторонніх мікроорганізмів. Також в ферментерах такої конструкції не виникає таких сильних гідродинамічних збурень (зсуву шарів рідини відносно одне одного), що обумовлює більш м'яку дію на клітини. Але при цьому швидкість абсорбції кисню в таких апаратах становить $2-8 \text{ кг/м}^3 \cdot \text{год}$, що є значним недоліком при культивуванні бактерій роду *Rhizobium*.

Для виготовлення нітрагіну використовують ферментери з механічним перемішуючим пристроєм (рисунок 5.1, А). В реакторах такого типу газ потрапляє через газорозподілювач (барботер).

Для рівномірного розподілення газу по всьому об'єму біореактора використовуються мішалки – одна або декілька. Лопатеві та турбінні мішалки є найбільш часто застосовуваними в конструкціях ферментерів у поєднанні з барботерами.

Конструкція лопатевої мішалки показана на рисунку 5.2. Мішалка має циліндричну втулку 2 з прикріпленими до неї лопатями. Число лопатей – дві і більше. Основні переваги лопатевих мішалок - простота пристрою та невисока вартість виготовлення. До недоліків мішалок цього типу слід віднести слабе перемішування в осьовому напрямку та перемішування рідини тільки в області, що прилягає безпосередньо до мішалки.

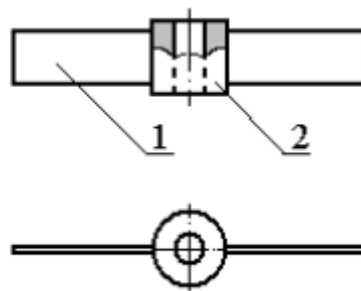


Рисунок 5.2 – Лопатева мішалка. 1 – лопаті; 2 – втулка.

Найбільш ефективними для диспергування газу в рідині вважають турбінні мішалки. Дані мішалки можуть бути відкритого або закритого типу (рисунок 5.3). В них на диску 2 укріплюються радіальні, нахилені або вигнуті лопаті 1. У закритих мішалках лопаті покриті кільцями 4 і 5, за рахунок чого створюються більш потужні радіальні потоки рідини. Найбільш простою за конструкцією, але в той самий час високопродуктивною, є турбінна мішалка з прямими лопатями, що розміщені радіально. Вони розбивають крупні пухирці повітря, розносять їх по всьому реактору і збільшують час їх перебування в культуральній рідині. Тому обираємо саме цю конструкцію.

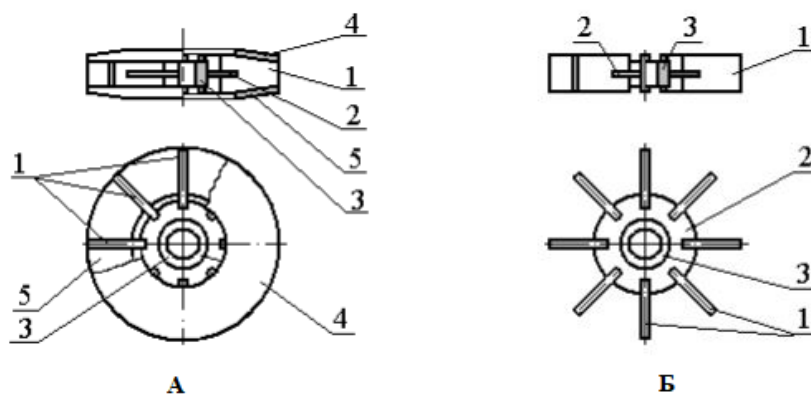


Рисунок 5.3 – Конструкції турбінних мішалок: А – турбінна мішалка закритого типу; Б – турбінна мішалка відкритого типу. 1 – лопаті; 2 – диск; 3 – втулка; 4 і 5 – покривні кільця.

Для регуляції температури використовують зовнішні сорочки, або змійовики, що поміщені всередину реактору. Використання внутрішніх

змійовиків більш ефективно, але вони можуть обростати шаром клітин, що перешкоджає теплообміну, іноді перешкоджає інтенсивному перемішуванню. Також такий змійовик може утруднювати стерилізацію, тому краще використовувати зовнішню сорочку. Оскільки апарат має об'єм менше $6,3 \text{ м}^3$, сорочка виконується суцільно [42].

Основними перевагами таких ферментерів є можливість широкого варіювання режиму перемішування і аерації середовища, відповідно, і показників масопередачі. Швидкість абсорбції O_2 в таких ферментерах становить $5\text{-}20 \text{ кг/м}^3 \cdot \text{год}$ і змінюється за рахунок варіювання числа обертів мішалки, витрат газу, тиску в апараті.

Недоліками такої конструкції є інтенсивне піноутворення під час перемішування, але ця проблема вирішується використанням лише 40% загального об'єму біореактора. Таким чином попереджується втрата культуральної рідини [43; 44].

Корпус і всі поверхні, що контактують з продуктом виконують з нержавіючої сталі марки AISI 316L, що збагачена молібденом. Вона корозостійка, стійка до впливів органічних, фосфорних і жирних кислот, саме тому знайшла широко використовується для виготовлення обладнання біотехнологічної галузі. Для неконтактуючих з продуктом поверхонь (сорочка ємності) використовують AISI 304.

5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічні розрахунки

Принцип роботи апарату. В ферментер через штуцери, розташовані на кришці апарату, завантажують поживне середовище та посівний матеріал. Аерація середовища забезпечується повітрям, що подається барботером, з'єднаним з трубою для підводу повітря. Процес регулюється автоматичних витратоміром повітря. Відпрацьоване повітря виводиться через штуцер, розміщений на кришці апарату.

Для диспергування повітря та інтенсифікації процесів масообміну встановлена турбінна мішалка з прямими лопатями. Турбінні мішалки працюють по принципу робочого колеса відцентрового насоса. Обертальний

рух лопатей створює радіальні потоки, що, в свою чергу, забезпечує циркуляцію рідини по об'єму. Мішалка закріплена на валу, що приводиться в рух за допомогою приводу, який встановлений на кришці апарату.

Апарат обладнаний суцільною зовнішньою сорочкою для регуляції температури середовища. Регулювання температури здійснюється шляхом подачі охолодженої води в металеву сорочку. Подача води здійснюється через автоматичний електромагнітний клапан, на основі показів датчика температури. При зниженні температури нижче заданої система активує нагрівання електричним нагрівальним елементом.

Для контролю рН середовища встановлюється датчик рН. При відхиленні значення рН від заданого здійснюється внесення рН-регулюючого компонента – 1н НСІ. Для цього апарат оснащений двома бутлями по 1 л.

Відбір проб здійснюється через стерильну систему відбору проб через пробовідбірний клапан.

Для вивантаження культури в днищі апарату передбачений спускний штуцер.

Для культивування *Rhizobium meliloti* Л5-1/24 обираємо ферментер об'ємом 130 л з об'ємом заправки 50 л [45].

Визначимо кількість ферментерів, необхідних для забезпечення необхідної продуктивності ферментації.

Посівна площа люцерни в Україні становить 1,8 млн га [9]. Норма висіву люцерни – 16 кг/га [46]. Норма обробки насіння - 1,6 кг сухого інокуляту на 1 т насіння. Тоді задана продуктивність, з урахуванням забезпечення 12% ринку добрив [47] становитиме:

$$G = \frac{S \cdot N_{\text{висів}}}{1000} \cdot N_{\text{об.нас.}} \cdot 0,12 = \frac{1\,800\,000 \cdot 16}{1000} \cdot 1,6 \cdot 0,12 = 5529,6 \frac{\text{кг}}{\text{рік}},$$

де S – посівна площа люцерни, га; $N_{\text{висів}}$ – норма висіву люцерни, кг/га; $N_{\text{об.нас.}}$ – норма обробки насіння препаратом нітрагіну кг/т.

Час роботи в цеху приймається $\tau = 300$ днів на рік.

Продуктивність одного ферментера визначаємо за формулою:

$$G_H = \frac{M_H}{\tau_p \cdot 3600} = \frac{19,9}{25 \cdot 3600} = 0,00022 \frac{\text{кг}}{\text{с}},$$

де M_H – вихід сухого нітрагіну з одного ферментера, кг; τ_p – час роботи ферментера, год.

Тоді необхідна кількість ферментерів буде визначатись за формулою:

$$n_\phi = \frac{G}{\tau \cdot 24 \cdot 3600 \cdot G_H} = \frac{5529,6}{300 \cdot 24 \cdot 3600 \cdot 0,00022} = 0,97.$$

Тоді приймаємо кількість $n_\phi = 1$. Дійна продуктивність за рік буде:

$$G = G_H \cdot n_\phi \cdot \tau \cdot 24 \cdot 3600 = 0,00022 \cdot 1 \cdot 300 \cdot 24 \cdot 3600 = 5702,4 \frac{\text{кг}}{\text{рік}}.$$

Отже, для забезпечення заданої продуктивності обираємо 1 ферментер.

Розрахуємо геометричні параметри ферментеру.

Вихідні дані:

Загальний об'єм апарату $V_{\text{заг}}$, м ³	0,13;
робочий об'єм апарату $V_{\text{роб}}$, м ³	0,05.

Приймаємо внутрішній діаметр апарату $D_{\text{вн}} = 500$ мм . В такому випадку апарат має еліптичне днище і плоску кришку.

Еліптичне днище для апарату такого діаметру має такі визначальні розміри (рисунок 5.4) [48]:

Висота еліптичної частини $h_b = 125$ мм , висота відбортовки $h_1 = 25$ мм, товщина стінки $s = 10$ мм, внутрішня поверхня $F = 0,31$ м², ємність днища $V = 21,2$ дм³ $m = 25,2$ кг.

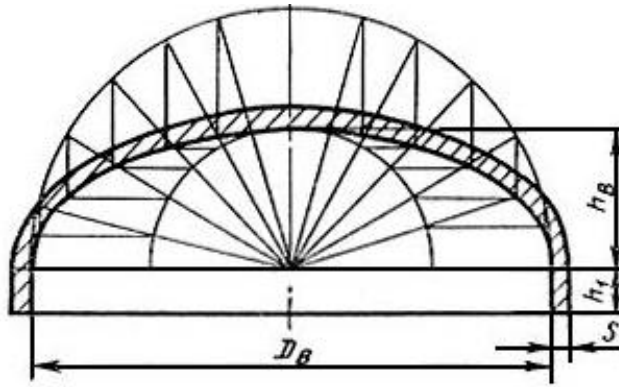


Рисунок 5.4 – Визначальні розміри еліптичних днищ

Повний об'єм ферментера:

$$V_{\text{п}} = V_{\text{ц}} + V_{\text{дн}} = 0,13 \text{ м}^3.$$

Об'єм циліндричної частини ферментера:

$$V_{\text{ц}} = V_{\text{п}} - V_{\text{дн}} = 0,13 - 0,0212 = 0,1088 \text{ м}^3,$$

де $V_{\text{дн}}$ – об'єм еліптичного днища, м^3 .

Висота циліндричної частини ферментера:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} = \frac{0,1088}{0,785 \cdot 0,5^2} = 0,554 \text{ м.}$$

де $F = 0,785 \cdot D^2$.

Загальна висота ферментера:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + (h_{\text{в}} + h_1) = 0,554 + (0,125 + 0,025) = 0,704 \text{ м.}$$

Об'єм рідини в циліндричній частині у ферментері:

$$V_{\text{рц}} = V_{\text{рп}} - V_{\text{рд}} = 0,05 - 0,0212 = 0,0288 \text{ м}^3.$$

де $V_{\text{рп}}$ – робочий об'єм ферментера, м^3 ; $V_{\text{рд}} = V_{\text{дн}}$ – об'єм рідини у днищі ферментера, м^3 .

Тоді висота рідини в циліндричній частині буде визначатись за формулою:

$$H_{\text{рц}} = \frac{4V_{\text{рц}}}{\pi \cdot D^2} = \frac{4 \cdot 0,0288}{\pi \cdot 0,5^2} = 0,147 \text{ м.}$$

Загальна висота рідини в ферментері:

$$H_{\text{р}} = H_{\text{рц}} + h_{\text{в}} + h_1 = 0,147 + 0,125 + 0,025 = 0,297 \text{ м.}$$

Отже, основними геометричними параметрами ферментера є загальна висота апарату $H_{\text{заг}} = 0,704$ м, висота циліндричної частини $H_{\text{ц}} = 0,554$ м, висота еліптичної частини $h_{\text{в}} = 0,125$ м, висота відбортки $h_1 = 0,025$ м.

Розрахуємо перемішуючий пристрій.

Вихідні дані:

внутрішній діаметр апарата D , м	0,5;
висота рівня рідини $H_{\text{р}}$, м	0,297.

Визначимо основні розміри перемішуючого пристрою (рисунок 5.5) [49].

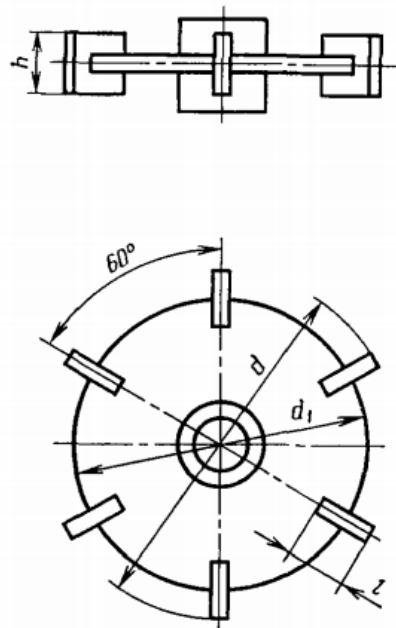


Рисунок 5.5 - Визначальні розміри турбінних мішалок

Діаметр турбінної мішалки для ємностей діаметром $D = 250 \pm 585$ мм рекомендується приймати наступним [50]:

$$d_{\text{м}} = (0,2 \div 0,4) D = 100 \pm 200 \text{ мм.}$$

Приймемо із стандартного ряду діаметр мішалки $d_{\text{м}} = 200$ мм.

Тоді основні визначальні розміри мішалки: $h = 40$ мм; $d_1 = 150$ мм; $l = 50$ мм.

Відстань від днища до мішалки:

$$h_d = d_m(0,4 \div 1,0) = 80 \div 200 \text{ мм.}$$

Прийmemo $h_d = 180$ мм.

Частота обертання мішалки:

$$n = \frac{\omega}{\pi \cdot d_m} = \frac{2,5}{3,14 \cdot 0,2} = 3,98 \text{ с}^{-1},$$

де ω – окружна швидкість мішалки, яку приймаємо 2,5 м/с.

Округлюємо це значення до стандартного $n = 4,17 \text{ с}^{-1}$.

Визначимо необхідність встановлення перегородок в апараті.

Розрахуємо параметри Γ та $Re_{цб}$ для визначення глибини воронки в апараті:

$$\Gamma = \frac{8H_p}{D} + 1 = \frac{8 \cdot 0,297}{0,5} + 1 = 5,752.$$

$$Re_{цб} = \frac{n \cdot d_m^2 \cdot \rho_p}{\mu_p} = \frac{4,17 \cdot 0,2^2 \cdot 1001,72}{0,00103} = 162\,220,3,$$

де ρ_p – густина культуральної рідини, кг/м³; μ_p – динамічна в'язкість культуральної рідини, Па·с.

Густину культуральної рідини знаходимо за формулою [51]:

$$\rho_p = \rho_v(1 + 0,32 \cdot C) = 997,04(1 + 0,32 \cdot 0,01467) = 1001,72 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3},$$

де ρ_v – густина води за температури 25°C, кг/м³; $C = 1,467\%$ – концентрація абсолютно сухої біомаси.

Динамічну в'язкість культуральної рідини знаходимо за формулою:

$$\mu_p = \mu_v \cdot e^{9,2C} = 0,9 \cdot 10^{-3} \cdot e^{9,2 \cdot 0,01467} = 0,00103 \text{ Па} \cdot \text{с},$$

де μ_v – динамічна в'язкість води при 25°C, Па·с.

Параметр E розраховується за формулою:

$$E = \frac{\Gamma}{\zeta_m z Re_{цб}^{0,25}} = \frac{5,752}{8,4 \cdot 1 \cdot 162\,220,3^{0,25}} = 0,03412,$$

де z – число мішалок на валу; ζ_m - коефіцієнт гідравлічного опору мішалки.

Знаходимо за значенням E значення $B = 13$ [52].

Глибину воронки знаходять за формулою:

$$h_b = \frac{Bn^2d_m^2}{2} = \frac{13 \cdot 17,3889 \cdot 0,04}{2} = 4,52 \text{ м}$$

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{гр} = H_p - h_d = 0,297 - 0,18 = 0,117 \text{ м.}$$

$h_b > h_{гр}$, тому необхідно встановити перегородки.

Діаметр валу мішалки $d_b = 40$ мм.

За діаметром валу вибирає ущільнення з метою герметизації щілин між рухомими і нерухомими деталями – ТСФ (одинарне).

Потужність, що втрачається при ущільненні:

$$N_{ущ} = 6020d_b^{1,3} = 6020 \cdot 0,04^{1,3} = 91,68 \text{ Вт.}$$

Для турбінної мішалки в апараті з перегородками при $Re_{цб} = 162\,220,3$ знаходимо значення критерія $K_N = 7$.

Потужність, що витрачається на перемішування, визначаємо по формулі:

$$N_m = K_N \rho_p n^3 d_m^5 = 7 \cdot 1001,72 \cdot 4,17^3 \cdot 0,2^5 = 162,7 \text{ Вт.}$$

Для розрахунку потужності електродвигуна приймаємо додаткові умови – наявності в апараті внутрішніх пристроїв: гільза термопари, рівнемір, пристрій для відбору проб, труба передавлювання. Для них $K_i = 1,1$. Тоді коефіцієнт, що враховує наявність у ферментері внутрішніх пристроїв становитиме:

$$\sum K_i = 1,1 + 1,1 + 1,1 + 1,1 = 4,4.$$

Коефіцієнт висоти рівня рідини в апараті:

$$K_H = \left(\frac{H_p}{D}\right)^{0,5} = \left(\frac{0,297}{0,5}\right)^{0,5} = 0,77.$$

При цих даних для апарату з перегородками отримаємо:

$$N_{ел} = \frac{K_{п} K_H \sum K_i N_m + N_{ущ}}{\eta} = \frac{1 \cdot 0,77 \cdot 4,4 \cdot 162,7 + 91,68}{0,8} = 803,86 \text{ Вт,}$$

де $K_{\Pi} = 1$ – для апаратів з перегородками; η – КПД.

Розрахуємо барботер [53].

Вихідні дані:

Густина повітря $\rho_{\text{пов}}, \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$ 1,165.

Відстань від мішалки до барботера:

$$h_{\text{б}} = 0,25 \cdot d_{\text{м}} = 50 \text{ мм.}$$

Приймаємо, що швидкість повітря в апараті $W_{\Gamma} = 0,045 \frac{\text{м}}{\text{с}}$.

Тоді його витрата:

$$G_{\text{пов}} = \frac{\pi \cdot D^2}{4} W_{\Gamma} = \frac{3,14 \cdot 0,5^2}{4} \cdot 0,045 = 0,0088 \frac{\text{м}^3}{\text{с}}.$$

Приймаємо, що швидкість виходу повітря з отворів барботеру становить 25 м/с. Тоді площа всіх отворів барботеру:

$$\sum F_{\text{отв}} = \frac{G_{\text{пов}} \cdot \rho_{\text{пов}}}{W_{\text{пов}}} = \frac{0,0088 \cdot 1,165}{25} = 0,00041 \text{ м}^2.$$

Приймаємо, що діаметр одного отвору становить 5 мм з відповідною площею $1,963 \cdot 10^{-5} \text{ м}^2$.

Визначаємо кількість отворів:

$$n_{\text{отв}} = \frac{\sum F_{\text{отв}}}{F_{\text{отв}}} = \frac{0,00041}{1,963 \cdot 10^{-5}} = 21 \text{ шт.}$$

Діаметр кільця барботеру дорівнює діаметру мішалки:

$$d_{\text{барб}} = 0,2 \text{ м.}$$

Довжина кола, на якому повинні бути розташовані отвори:

$$l = d_{\text{барб}} \cdot 3,14 = 0,2 \cdot 3,14 = 0,628 \text{ м.}$$

Відстань між сусідніми отворами:

$$x = \frac{l}{n_{\text{отв}}} = \frac{0,628}{21} = 0,03 \text{ м.}$$

Діаметр труби барботера:

$$D_{\text{барб}} = 5x = 5 \cdot 30 = 150 \text{ мм.}$$

Отже діаметр кільця барботера – 200 мм, кількість отворів – 21, розташованих в один ряд, внутрішній діаметр труби барботера – 150 мм.

Здійснимо тепловий розрахунок [54].

Вихідні дані:

Внутрішній діаметр сорочки апарата $D_{\text{об}}$, м	0,55;
товщина стінки корпусу апарата δ , м	0,01;
внутрішній діаметр апарата D , м	0,5;
частота обертання мішалки n , с^{-1}	4,17;
діаметр відкритої турбінної мішалки $d_{\text{м}}$, м	0,2;
температура води при вході в сорочку $t_{\text{п}}$, К	288;
температура води при виході з сорочки $t_{\text{к}}$, К	293;
температура середовища $t_{\text{кр}}$, К	298.

Об'єм посівного матеріалу, що вноситься в ферментер $V_{\text{пм}} = 0,005 \text{ м}^3$, об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}} = 0,045 \text{ м}^3$.

Приймаємо, що теплофізичні властивості посівного матеріалу, поживного середовища та культуральної рідини рівні. Тоді маса посівного матеріалу, поживного середовища та культуральної рідини становлять:

$$M_{\text{пм}} = \rho_{\text{пм}} \cdot V_{\text{пм}} = 1001,72 \cdot 0,005 = 5,009 \text{ кг};$$

$$M_{\text{пс}} = \rho_{\text{пс}} \cdot V_{\text{пс}} = 1001,72 \cdot 0,045 = 45,08 \text{ кг};$$

$$M_{\text{кр}} = \rho_{\text{кр}} \cdot V_{\text{кр}} = 1001,72 \cdot 0,05 = 50,09 \text{ кг.}$$

Надходження енергії у ферментер для вирощування посівного матеріалу відбувається:

1) з поживним середовищем:

$$E_{\text{пс}} = M_{\text{пс}} C_{\text{пс}} t_{\text{пс}} = 45,08 \cdot 4162 \cdot 298 = 55,9116 \text{ МДж},$$

де C – питома теплоємність культуральної рідини при 25°C , $\frac{\text{Дж}}{\text{кг}\cdot\text{K}}$; t – температура культивування, К.

2) з посівним матеріалом:

$$E_{\text{пм}} = M_{\text{пм}} C_{\text{пм}} t_{\text{пм}} = 5,009 \cdot 4162 \cdot 298 = 6,2125 \text{ МДж.}$$

3) з повітрям:

$$E_{\text{пов}_1} = \rho_{\text{пов}} G_{\text{пов}} \tau_{\text{культ}} C_{\text{пов}} t_{\text{пов}} = 1,184 \cdot 0,0088 \cdot 90\,000 \cdot 1005 \cdot 298 = \\ = 280,8402 \text{ МДж,}$$

де $\rho_{\text{пов}}$ – густина повітря при температурі 25°C , $\text{кг}/\text{м}^3$; $C_{\text{пов}}$ – питома теплоємність повітря при 25°C , $\frac{\text{Дж}}{\text{кг}\cdot\text{K}}$; $\tau_{\text{культ}}$ – тривалість культивування, с.

4) теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв:

$$E_{\text{дис}_1} = N_{\text{м}} \tau = 162,7 \cdot 90\,000 = 14,643 \text{ МДж.}$$

5) дисипативна енергія, що надходить від руху повітря через рідини:

$$E_{\text{дис}_2} = \rho_{\text{с}} G_{\text{пов}} g \tau_{\text{культ}} H_{\text{р}} = 1001,72 \cdot 0,0088 \cdot 9,8 \cdot 90\,000 \cdot 0,297 \\ = 2,309160 \text{ МДж,}$$

де g – прискорення вільного падіння, $\text{м}/\text{с}^2$.

6) енергія, що утворюється під час згорання цукрів:

$$E_{\text{ц}} = m_{\text{цук}} r_{\text{цук}} = 4,51 \cdot 16,5 = 74,415 \text{ МДж,}$$

де $m_{\text{цук}} = 4,51 \text{ кг}$; $r_{\text{цук}} = 16,5 \frac{\text{МДж}}{\text{кг}}$.

Сумарна кількість надходжень теплоти:

$$\sum E_{\text{надх}} = E_{\text{пс}} + E_{\text{пм}} + E_{\text{пов}_1} + E_{\text{дис}_1} + E_{\text{дис}_2} + E_{\text{ц}} = \\ = 55,9116 + 6,2125 + 280,8402 + 14,643 + 2,309160 + 74,41 = \\ = 434,33146 \text{ МДж.}$$

Витрати теплової енергії здійснюються:

1) з культуральною рідиною:

$$E_{\text{кр}} = M_{\text{кр}} C_{\text{кр}} t_{\text{кр}} = 50,09 \cdot 4162 \cdot 298 = 62,1254 \text{ МДж.}$$

2) з повітрям:

$$E_{\text{пов}_2} = \rho_{\text{пов}} G_{\text{пов}} \tau_{\text{культ}} C_{\text{пов}} t_{\text{пов}} = 1,184 \cdot 0,0088 \cdot 90\,000 \cdot 1005 \cdot 298 = \\ = 280,8402 \text{ МДж.}$$

3) втрати теплоти в навколишнє середовище при нагріванні:

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot (E_{\text{кр}} + E_{\text{пов}_2}) = 0,02 \cdot (62,1254 + 280,8402) = 6,8593 \text{ МДж.}$$

Сумарні витрати теплоти:

$$\sum E_{\text{втр}} = E_{\text{кр}} + E_{\text{пов}_2} + E_{\text{втр}} = 62,1254 + 280,8402 + 6,8593 = \\ = 349,8249 \text{ МДж.}$$

Теплове навантаження в ферментері становить:

$$E_{\text{т}} = \sum E_{\text{втр}} - \sum E_{\text{надх}} = 349,8249 - 434,33146 = -84,50926 \text{ МДж.}$$

Оскільки $E_{\text{т}} < 0$, для підтримання температури культивування ферментер необхідно охолоджувати.

$$Q = |E_{\text{т}}| = 84,50926 \text{ МДж.}$$

$$Q = M_{\text{т}} C_{\text{т}} \Delta t,$$

де $M_{\text{т}}$ – маса теплоносія, кг; $C_{\text{т}}$ – питома теплоємність теплоносія, $\frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}$.

Середній температурний напір:

$$\frac{\Delta t_6}{\Delta t_{\text{м}}} = \frac{10}{5} = 2 \geq 2 \rightarrow \Delta t = \frac{\Delta t_6 - \Delta t_{\text{м}}}{\ln \frac{\Delta t_6}{\Delta t_{\text{м}}}} = \frac{10 - 5}{\ln \frac{10}{5}} = \frac{5}{0,693} = 7,215 \text{ К;}$$

$$\Delta t_6 = t_{\text{кр}} - t_{\text{п}} = 298 - 288 = 10 \text{ К;}$$

$$\Delta t_{\text{м}} = t_{\text{кр}} - t_{\text{к}} = 298 - 293 = 5 \text{ К,}$$

де $t_{\text{кр}}$ – температура середовища культивування, К; $t_{\text{п}}$ – температура теплоносія (води) на вході в сорочку ферментера, К; $t_{\text{к}}$ – температура теплоносія (води) на виході з сорочки в ферментера.

Середня температура охолоджуючої води:

$$t_{\text{сер}} = \frac{t_{\text{п}} + t_{\text{к}}}{2} = \frac{288 + 293}{2} = 290,5 \text{ К.}$$

Температура стінки апарату:

$$t_{\text{ст}} = \frac{t_{\text{кр}} - t_{\text{сер}}}{2} = \frac{298 + 290,5}{2} = 294 \text{ К.}$$

Маса теплоносія:

$$M_T = \frac{Q}{C_T \Delta t} = \frac{84,50926 \cdot 10^6}{4179 \cdot 5} = 4044,47 \text{ кг.}$$

Масові витрати теплоносія:

$$G_T = \frac{M_T}{\tau_{\text{культ}}} = \frac{4044,47}{90\,000} = 0,045 \frac{\text{кг}}{\text{с}}.$$

Визначення коефіцієнту тепловіддачі від середовища до стінки апарату:

Визначимо критерій Прандтля:

$$Pr_c = \frac{\mu_c C_c}{\lambda_c} = \frac{0,00103 \cdot 4162}{0,64} = 6,7,$$

де λ_c - коефіцієнт теплопровідності культуральної рідини, $\frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$.

Критерій Рейнольдса при перемішуванні:

$$Re = \frac{n \cdot d_m^2 \cdot \rho_c}{\mu_c} = \frac{4,17 \cdot 0,2^2 \cdot 1001,72}{0,00103} = 162\,220,3.$$

Критеріальне рівняння для визначення критерію Нуссельта процесу тепловіддачі від середовища до стінки апарата в апараті з турбінною мішалкою і перегородками:

$$Nu = 0,76 \cdot Re^{0,67} Pr_c^{0,33} = 0,76 \cdot 162\,220,3^{0,67} \cdot 6,7^{0,33} = 4407,464.$$

Коефіцієнт тепловіддачі від середовища, що перемішується, до стінки:

$$\alpha_c = \frac{Nu_c \cdot \lambda_c}{D} = \frac{4407,464 \cdot 0,64}{0,5} = 5641,55 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}.$$

Визначення коефіцієнту тепловіддачі від стінки ферментера до рідини:

Об'ємні витрати теплоносія:

$$V_T = \frac{G_T}{\rho_T} = \frac{0,045}{999,10} = 4,5 \cdot 10^{-5} \frac{\text{м}^3}{\text{с}},$$

де ρ_T – густина теплоносія при 15°C, кг/м^3 .

Площа перетину сорочки:

$$f = \frac{\pi(D_{об}^2 - (D + 2\delta)^2)}{4} = \frac{\pi(0,55^2 - (0,5 + 2 \cdot 0,01)^2)}{4} = 0,025 \text{ м}^2,$$

де $D_{об}$ – внутрішній діаметр сорочки, м; δ – товщина стінки апарата, м.

Швидкість води в сорочці ферментера:

$$w = \frac{V_T}{f} = \frac{4,5 \cdot 10^{-5}}{0,025} = 0,0018 \frac{\text{м}}{\text{с}}.$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re = \frac{w \cdot d \cdot \rho_T}{\mu_T} = \frac{0,0018 \cdot 0,03 \cdot 999,10}{1,155 \cdot 10^{-3}} = 46,71,$$

де $d = D_{\text{об}} - (D - 2\delta) = 0,55 - (0,5 + 2 \cdot 0,01) = 0,03 \text{ м}$.

Оскільки $Re < 2300$, додаємо перегородку в сорочку розмірами $b = 0,005 \text{ м}$ та $l = 0,027 \text{ м}$ та робимо перерахунок.

$$w = \frac{V_T}{b \cdot l} = \frac{4,5 \cdot 10^{-5}}{0,005 \cdot 0,027} = 0,33 \frac{\text{м}}{\text{с}}.$$

Еквівалентний діаметр:

$$d_e = \frac{2(b \cdot l)}{b + l} = \frac{2(0,005 \cdot 0,027)}{0,005 + 0,027} = 0,009.$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re = \frac{w \cdot d \cdot \rho_T}{\mu_T} = \frac{0,33 \cdot 0,009 \cdot 999,10}{1,155 \cdot 10^{-3}} = 2580,28.$$

Критерій Нуссельта при перехідному режимі:

$$Nu = K_0 Pr^{0,43} \left(\frac{Pr_p}{Pr_{\text{ст}}} \right)^{0,25} = 4,9 \cdot 8,23^{0,43} \left(\frac{8,23}{7,011} \right)^{0,25} = 61,81,$$

де Pr_p – критерій Прандтля для води при температурі 15°C ; $Pr_{\text{ст}}$ – критерій Прандтля для води при температурі стінки 21°C ; K_0 – коефіцієнт, який залежить від значення Re .

Коефіцієнт тепловіддачі:

$$\alpha_2 = \frac{Nu \cdot \lambda_T}{d_e} = \frac{61,81 \cdot 0,587}{0,009} = 4031,4 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}.$$

Тоді коефіцієнт теплопередачі знайдемо за рівнянням:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_c} + \frac{\delta_{\text{ст}}}{\lambda_{\text{ст}}} + \frac{1}{\alpha_2}} = \frac{1}{\frac{1}{5641,55} + \frac{0,01}{15} + \frac{1}{4031,4}} = 913,2 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}.$$

Розрахункова площа поверхні теплообміну ферментера:

$$F = \frac{Q}{K \Delta t \tau_{\text{пр}}} = \frac{84,50926 \cdot 10^6}{913,2 \cdot 7,215 \cdot 90\,000} = 0,14 \text{ м}^2.$$

Дійсна площа теплообміну:

$$F_d = \pi(D + 2\delta)H_c = 3,14 \cdot (0,5 + 2 \cdot 0,01) \cdot 0,172 = 0,28 \text{ м}^2,$$

де $H_c = H_p - H_{\text{дн}} = 0,297 - 0,125 = 0,172 \text{ м}$ – висота сорочки.

Отже, поверхня теплообміну сорочки апарата забезпечить заданий температурний режим протягом його роботи.

Розрахуємо коефіцієнт масопереносу при механічному диспергуванні газу в рідині [55].

Вихідні дані:

Робочий об'єм апарату $V_{\text{роб}}$, м^3	0,05;
густина повітря $\rho_{\text{пов}}$, $\frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$	1,185 ;
діаметр відкритої турбінної мішалки d_m , м	0,2
внутрішній діаметр апарата D , м	0,5
висота рідини в ферментаторі H_p , м	0,297 ;
частота обертання мішалки n , с^{-1}	4,17;
витрати барботуючого газу $G_{\text{пов}}$, $\frac{\text{м}^3}{\text{с}}$	0,0088;
густина середовища ρ_p , кг/м^3	1001,72;
кінематична в'язкість культуральної рідини ν , $\frac{\text{м}^2}{\text{с}}$	$1,156 \cdot 10^{-6}$.

Схема процесу переносу кисню в ферментаторі подана на рисунку 5.6.

Потужність, що витрачається на перемішування газорідинної суміші:

$$N_{\text{гр}} = N_{\text{ел}} \left(1 - 1,26 \frac{G_{\text{пов}}}{n d_m} \right) = 803,86 \left(1 - 1,26 \frac{0,0088}{4,17 \cdot 0,2} \right) = 872,4 \text{ Вт.}$$

Дисипація енергії, що вводиться в одиницю об'єму рідини перемішуючим пристроєм:

$$\varepsilon_m = \frac{N_{\text{гр}}}{V_p} = \frac{872,4}{0,05} = 17448 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^3},$$

де V_p – робочий об’єм рідини в ферментері.

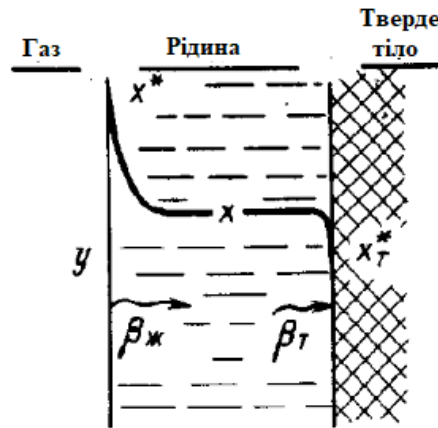


Рисунок 5.6 – Схема процесу переносу кисню

Дисипація енергії, що вводиться з барботуючим газом:

$$\varepsilon_r = \rho_p \cdot g \cdot W_r = 1001,72 \cdot 9,81 \cdot 0,045 = 442,21 \text{ Вт}$$

Приведена швидкість в апараті:

$$W_r = \frac{G_{\text{пов}}}{0,785 \cdot D^2} = \frac{0,0088}{0,785 \cdot 0,5^2} = 0,045 \frac{\text{м}}{\text{с}}$$

Швидкість спливання газових бульбашок:

$$u_6 = 1,5 \left(\sigma g \frac{(\rho_p - \rho_n)}{\rho_p^2} \right)^{0,25} = 1,5 \left(0,05 \cdot 9,81 \cdot \frac{1001,72 - 1,185}{1001,72^2} \right)^{0,25} = 0,223 \frac{\text{м}}{\text{с}},$$

де σ - поверхневий натяг рідини, Н/м; ρ_n – густина повітря, $\frac{\text{м}^3}{\text{с}}$.

Газовміст системи розраховуємо методом послідовних наближень.

Прийmemo $\varphi_r = 0,1$, тоді в першому наближенні:

$$\begin{aligned} \varphi_r &= \left(\frac{\varphi_r \cdot W_r}{u_6} \right)^{0,5} + 2,16 \cdot 10^{-4} \frac{\varepsilon_m^{0,4} \cdot \rho_p^{0,2}}{\sigma^{0,6}} \left(\frac{W_r}{u_6} \right)^{0,5} = \\ &= \left(\frac{0,1 \cdot 0,045}{0,223} \right)^{0,5} + 2,16 \cdot 10^{-4} \frac{17448^{0,4} \cdot 1001,72^{0,2}}{0,05^{0,6}} \left(\frac{0,045}{0,223} \right)^{0,5} = \\ &= 0,28. \end{aligned}$$

Друге наближення $\varphi_r = 0,45$:

$$\varphi_{\Gamma} = \left(\frac{0,45 \cdot 0,045}{0,223} \right)^{0,5} + 2,16 \cdot 10^{-4} \frac{17448^{0,4} \cdot 1001,72^{0,2}}{0,05^{0,6}} \left(\frac{0,045}{0,223} \right)^{0,5} = 0,44.$$

Приймаємо $\varphi_{\Gamma} = 0,44$.

Середній діаметр газових бульбашок:

$$d_{\delta} = 4,15 \cdot \left[\frac{\sigma^3}{\rho_p \cdot \varepsilon_M^2} \right]^{0,2} = 4,15 \cdot \left[\frac{0,05^3}{1001,72 \cdot 17448^2} \right]^{0,2} = 0,0035 \text{ м.}$$

Питома площа поверхні газових бульбашок:

$$a = 1,44 \cdot \left(\frac{\varepsilon_M^{0,4} \cdot \rho_p^{0,2}}{\sigma^{0,6}} \right) \cdot \left(\frac{W_{\Gamma}}{u_{\delta}} \right)^{0,5} = 1,44 \cdot \left(\frac{17448^{0,4} \cdot 1001,72^{0,2}}{0,05^{0,6}} \right) \cdot \left(\frac{0,045}{0,223} \right)^{0,5} =$$

$$= 733,18 \frac{\text{м}^2}{\text{м}^3}.$$

Критерій Шервуда знаходимо за формулою:

$$Sh = 0,33 \left(\frac{nd_M d_{\delta}}{v_p} \right)^{0,6} \cdot \left(\frac{v_p}{D_d} \right)^{0,5} =$$

$$= 0,33 \left(\frac{4,17 \cdot 0,2 \cdot 0,0035}{1,156 \cdot 10^{-6}} \right)^{0,6} \cdot \left(\frac{1,156 \cdot 10^{-6}}{2,12 \cdot 10^{-9}} \right)^{0,5} = 847,6,$$

де v_p – кінематична в'язкість культуральної рідини, $\frac{\text{м}^2}{\text{с}}$; D_d – коефіцієнт молекулярної дифузії, $\frac{\text{м}^2}{\text{с}}$.

Поверхневий коефіцієнт масопереносу:

$$\beta = \frac{Sh \cdot D_d}{d_{\delta}} = \frac{847,6 \cdot 2,12 \cdot 10^{-9}}{0,0035} = 0,0005 \frac{\text{м}}{\text{с}}.$$

Рівноважна концентрація кисню на межі розділу фаз:

$$x^* = \frac{y \cdot p \cdot \rho_p}{m} = \frac{0,21 \cdot 0,1 \cdot 1001,72}{4430} = 0,0047 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3},$$

Де p – тиск над рідиною в ферментері, МПа; m – коефіцієнт фазової рівноваги, при 25°C, МПа; y – середня концентрація кисню в повітрі, кг/м³.

Концентрація кисню розчиненого в об'ємі рідини:

$$x \approx 0,2 \cdot x^* \approx 0,2 \cdot 0,0047 \approx 0,00094 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}.$$

За законом Щукарева потік маси, що забезпечується перемішуванням, дорівнює масі кисню, що витрачається на реакцію за одиницю часу:

$$Q_{Q_2} = \beta \cdot F \cdot (x^* - x) = 0,0005 \cdot 36,659 \cdot (0,0047 - 0,00094) = 0,000069 \frac{\text{кг}}{\text{с}},$$

де F – площа поверхні контакту фаз:

$$F = a \cdot V_p = 733,18 \cdot 0,05 = 36,659 \text{ м}^2.$$

Отже, потік маси кисню від повітря до рідини при даному режимі перемішування складає $0,000069 \frac{\text{кг}}{\text{с}}$.

Розрахуємо гідравлічний опір і витрати тиску в сорочці [56].

Вихідні дані:

Внутрішній діаметр сорочки апарата $D_{об}$, м	0,55;
товщина стінки корпусу апарата δ , м	0,01;
швидкість води в сорочці ферментера w , м/с	0,33;
критерій Рейнольдса Re	46,71;
висота сорочки H_c , м	0,172;
густина води ρ , кг/м ³	999,1.

Витрати тиску на створення швидкості потоку:

$$\Delta p_{шв} = \frac{w^2 \rho}{2} = \frac{0,33^2 \cdot 999,10}{2} = 54,4 \text{ Па}.$$

Втрата тиску на прямій ділянці:

$$\Delta p_{тр} = \lambda \frac{H_c}{d_e} \cdot \frac{w^2 \rho}{2} = 1,37 \frac{0,172}{0,03} \cdot \frac{0,0018^2 \cdot 999,10}{2} = 0,0127 \text{ Па},$$

де $\lambda = \frac{64}{Re} = \frac{64}{46,71} = 1,37$ – коефіцієнт тертя, який залежить від режиму руху течії.

Втрати тиску на місцеві опори:

$$\Delta p_{мс} = \sum \xi \cdot \frac{w^2 \rho}{2} = (0,81 + 0,45) \cdot \frac{0,33^2 \cdot 999,10}{2} = 68,54 \text{ Па},$$

де $\sum \xi = \xi_p + \xi_z$ – сума коефіцієнтів місцевого опору, ξ_p – для розширення, ξ_z – для звуження.

Втрати тиску на підняття рідини:

$$\Delta p_{\text{під}} = \rho g H_c = 999,10 \cdot 9,81 \cdot 0,172 = 1685,8 \text{ Па.}$$

Сумарна втрата тиску:

$$\Delta p = \Delta p_{\text{шв}} + \Delta p_{\text{тр}} + \Delta p_{\text{мс}} + \Delta p_{\text{під}} = 54,4 + 0,0127 + 68,54 + 1685,8 = 1808,75 \text{ Па.}$$

Потужність, яка споживається насосом:

$$N = \frac{V \cdot \Delta p}{1000 \eta} = \frac{4,5 \cdot 10^{-5} \cdot 1808,75}{1000 \cdot 0,6} = 0,0001 \text{ кВт,}$$

де η – КПД насоса.

Отже, потужність, яка необхідна для підняття рідини в сорочі становить 0,0001 кВт.

Розрахуємо штуцери для подачі повітря та води [57].

Вихідні дані:

Масові витрати води G_B , кг/с	0,045;
густина води ρ , кг/м ³	999,1;
масові витрати повітря $G_{\text{п}}$, кг/с	0,0104;
густина повітря $\rho_{\text{пов}}$, $\frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$	1,185 ;

Приймаємо швидкість руху води в штуцері $w_B = 0,1$ м/с, швидкість руху повітря в штуцері $w_{\text{п}} = 15$ м/с.

Діаметр штуцера для подачі та відведення води:

$$d_B = \sqrt{\frac{4G_B}{\rho \pi w_B}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 0,045}{999,1 \cdot 3,14 \cdot 0,5}} = 0,024 \text{ м.}$$

Тоді діаметр штуцера $d_B = 25$ мм, товщина стінки $s_T = 3$ мм.

Діаметр штуцера для подачі та відведення повітря:

$$d_{\Pi} = \sqrt{\frac{4G_{\Pi}}{\rho \pi w_{\Pi}}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 0,0104}{1,185 \cdot 3,14 \cdot 15}} = 0,027 \text{ м}$$

Тоді діаметр штуцера $d_{\text{в}} = 32$ мм, товщина стінки $s_{\text{т}} = 3$ мм.

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

Для забезпечення обертання перемішуючого пристрою необхідно встановити мішалку. Розраховане значення потужності мотору $N_{\text{ел}} = 803,86$ Вт. Вибираємо в якості приводу мішалки мотор-редуктор типу NR102 з потужністю електродвигуна $N_{\text{ел}} = 1,1$ кВт з каталогу компанії ООО «Приводные технологии».

Для забезпечення подачі води в теплообмінну сорочку обираємо рециркуляційний насос RODA 15-15E2 з потужністю 2,5 Вт з каталогу компанії «Röda». Максимальна продуктивність насосу – $0,7 \text{ м}^3/\text{год}$, з максимальною висотою напору 1 м.

Для забезпечення подачі посівного матеріалу та поживного середовища використовується шестеренний насос FORMULA (FP) з максимальним робочим об'ємом $150 \text{ см}^3/\text{об}$, максимальним тиском – 290 бар.

В якості індивідуального фільтра обираємо патронний фільтруючий елемент марки ЕПМ.Ф4 з каталогу компанії «Технофільтр-Украина», що виготовлений на основі фільтруючого матеріалу поліефірсульфон. Основою фільтруючого елемента ЕПМ. Ф4 є гофрована гідрофобна мембрана з політетрафторетилену. Середній розмір пор мембрани складає 0.20 мкм . Внутрішній і зовнішній корпус, кінцеві деталі виготовлені з термостійкого поліпропілену.

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Загальні вимоги безпеки при обслуговуванні ферментера:

1. До обслуговування ферментерів допускаються тільки особи, що досягли 18-річного віку, пройшли попередній медичний огляд, курсове навчання, інструктаж по безпечному обслуговуванню ферментерів.

2. Обслуговуючий персонал повинен дотримуватися вимог по електробезпеці при роботі з ферментерами.

3. В приміщеннях, в яких розміщені ферментери мають бути дотримані правила пожежної безпеки.

4. Зберігати в ферментаційному приміщенні сторонні предмети, що загромождають і забруднюють приміщення, заборонено.

Ферментатори повинні бути оснащені контрольно-вимірювальними приладами для визначення рН середовища, температури середовища, рівня рідини в апараті та ін. Згідно з технологічною схемою ведення процесу.

5. Забороняється завантаження кислоти у ферментер вручну. Для подачі кислоти повинна бути передбачена самостійна кислотна лінія.

6. Відбір проб з ферментаторів повинен проводитися способами, що виключають контакт обслуговуючого персоналу з культуральними рідинами.

7. Всі роботи з ферментаторі повинні проводитися відповідно до регламентів та експлуатаційними документами, затвердженими в установленому порядку.

Вимоги безпеки перед початком роботи з ферментом:

1. Застібнути спеціальний одяг на всі гудзики (зав'язки), забрати волосся під головний убір.

2. Підготувати ферментер до безпечної роботи:

- візуально перевірити справність електроживлення та захисного заземлення;

- роботу запобіжних клапанів, блокуючих пристроїв і контрольно-вимірювальних пристроїв;

- наявність і стан деталей, вентелів, шлангів.

Вимоги безпеки під час роботи з ферментом:

1. Персоналу, що обслуговує ферментер, забороняється:

- відключати подачу води при роботі нагрівача ферментера;

- працювати з ферментом, шлангами, що мають дефекти, що знижують його міцність і стійкість;

- працювати на ферментерах по закінченню термінів гідравлічних випробувань і перевірок манометрів.

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях:

1. Робота ферментерів має бути зупинена у випадках:

- якщо тиск в манометрі піднімається вище дозволеного, не дивлячись на дотримання всіх вимог по режиму роботи;

- при несправності запобіжних клапанів;

- при виявленні в елементах ферментера тріщин, здуття, пропусків або розривів прокладки;

- при виникненні пожежі;

- при несправності манометра (відсутність пломби або клейма, прострочений строк перевірки, стрілка манометра при його виключенні не повертається на нульову відмітку шкали, є пошкодження, що можуть вплинути на правильність показів манометра) або контрольних панелей ферментера;

- при несправності або не повній кількості деталей ферментера;

- при несправності запобіжних блокуючих пристроїв, вимірювальних приладів і засобів автоматики ферментера.

Вкінці робочого дня необхідно ретельно вимити руки і виконати всі вимоги особистої гігієни.

Охорона навколишнього середовища забезпечується застосуванням матеріалів, що відповідають вимогам екологічної безпеки, і виконанням вимог, правил і норм з охорони навколишнього середовища.

Відходи, що виділяються в процесі виробництва сухого нітрагіну, відображені в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1. Відходи виробництва

Відходи	Стадія виробництва	Спосіб утилізації
1	2	3
Відпрацьовані дезінфікуючі розчини	ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень	Хімічне очищення. Подача у збірник нейтралізації.

Продовження таблиці 5.1

1	2	3
Відпрацьовані миючі розчини	ДР 2.1. Мийка обладнання та комунікацій	Хімічне очищення. Подача у збірник нейтралізації.
Конденсат	ДР 3.4. Охолодження повітря	Злив у каналізацію.
Конденсат	ДР 3.5. Осушення повітря	Злив у каналізацію.
Надосадова рідина	ТП 8.1. Осадження біомаси шляхом відстоювання	Утилізація в системі стічних вод.
Фугат	ТП 8.2. Центрифугування осаду	Утилізація в системі стічних вод.
Конденсат	ТП 8.2. Вакуум-висушування бактерій	Утилізація в системі стічних вод.

Вода, що витрачається на технологічні потреби (подача в сорочку ферментера, в теплообмінник), направляється в систему оборотного водопостачання.

Викиди в атмосферу токсичних сполук відсутні. Для очищення відпрацьованого повітря від мікроорганізмів після виробничого культивування і сушіння біомаси, використовують скрубери Вентурі (рисунок 5.6).

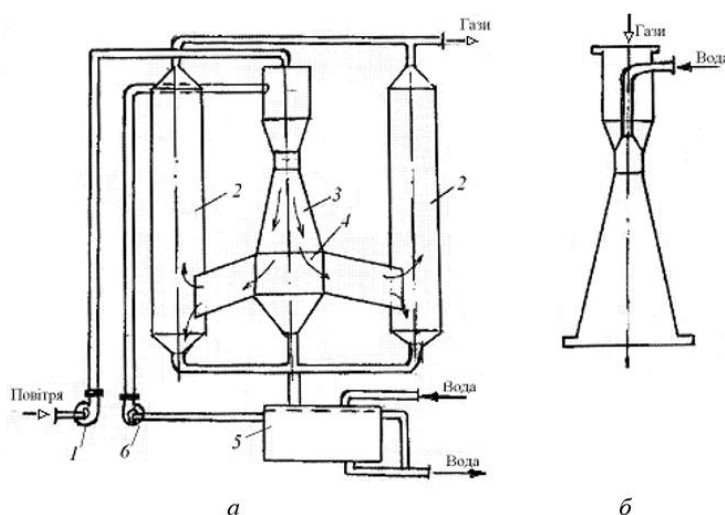


Рисунок 5.6. – Установка для очищення (а) та скрубери Вентурі (б)

Із виробничих апаратів повітря вентилятором 1 подається в трубу Вентурі 3, де змішується з водою. В апараті 4 відбувається відділення крапель

рідини від газу. Із інерційного апарату 4 суміш газу, води та укрупнених частинок продукту надходить у відцентрові скрубери 2, де відбувається кінцеве відділення частинок води, речовини від газу. Газ надходить вгору, решта – донизу в збірник 5. Насосом 6 зібрана вода разом з добавкою нової води подається знову в трубу Вентурі [58].

ВИСНОВКИ

1. В проєкті для виробництва сухого препарату нітрагіну обрано конкурентноспроможний продуцент *Rhizobium meliloti* Л5-1/24 з високим рівнем азотфіксації.

2. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості обраного штаму *Rhizobium meliloti* Л5-1/24, обґрунтований вибір поживного середовища на основі кукурудзяного екстракту, глюкози та дріжджового екстракту для виробничого біосинтезу, що дозволяє отримати необхідний титр бактерій та забезпечити зберігання інокулянту до 6 місяців без розвитку сторонньої мікрофлори.

3. Оптимізовано метод отримання сухого препарату за рахунок адсорбції бактерій на бентоніті перед сушінням, що дозволяє підвищити життєздатність бактерій при висушуванні, а, отже, і збільшити його ефективність.

4. Обрано ферментаційний апарат об'ємом 130 л з механічним перемішуючим пристроєм та барботером, що дозволяє забезпечити необхідну річну продуктивність 5529,6 кг препарату на рік та забезпечує необхідні параметри культивування: $\text{pH}=6,5-7,5$; рівень аерації $0,8-1,2 \text{ м}^3/\text{м}^3 \cdot \text{хв}$; перемішування $n=300-400 \text{ об/хв}$; $\tau=22-25 \text{ год}$, $t=25-28^\circ\text{C}$.

5. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено технологічну та апаратурну схеми виробництва сухого препарату нітрагіну в поліетиленових пакетах по 200/400/1000 г.

